Pest Management Regulatory Agency
Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire

Proposed Regulatory Decision Document PRDD2003-07

Mycostop Biofungicide
Streptomyces griseoviridis strain K61

The microorganism, *Streptomyces griseoviridis* strain K61 and the associated end-use product Mycostop Biofungicide are proposed for full registration under Section 13 of the Pest Control Products (PCP) Regulations for control of diseases on greenhouse cucumbers, tomatoes, peppers and greenhouse ornamentals. This product was submitted to Health Canada's PMRA under the User Requested Minor Use Registration (URMUR) program.

This Proposed Regulatory Decision Document provides a summary of data received and the rationale for the proposed full registration of these products. The Pest Management Regulatory Agency (PMRA) will accept written comments on this proposal up to 45 days from the date of publication of this document. Please forward all comments to the Publications Coordinator at the address below.

(publié aussi en français) **April 10, 2003**

This document is published by the Alternative Strategies and Regulatory Affairs Division, Pest Management Regulatory Agency. For further information, please contact:

Publications Coordinator
Pest Management Regulatory Agency
Health Canada
2720 Riverside Drive
A.L. 6605C
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

Internet: pmra_publications@hc-sc.gc.ca
www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/
Information Service:
1-800-267-6315 or (613) 736-3799
Facsimile: (613) 736-3798

Health Canada Santé Canada

Canada

ISBN: 0-662-33980-0
Catalogue number: H113-9/2003-7E

© Her Majesty the Queen in Right of Canada, represented by the Minister of Public Works and Government Services Canada 2003

All rights reserved. No part of this information (publication or product) may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical photocopying, recording or otherwise, or stored in a retrieval system, without prior written permission of the Minister of Public Works and Government Services Canada, Ottawa, Ontario K1A 0S5.

103-05809/

Foreword

The submission for full registration of the microbial *Streptomyces griseoviridis* strain K61 and the end-use product Mycostop Biofungicide, a microbial biopesticide developed by Kemira Agro Oy for control of damping-off, root and stem rot, and wilt caused by *Fusarium* on greenhouse cucumbers, tomatoes, peppers and greenhouse ornamentals has been reviewed by the Pest Management Regulatory Agency (PMRA) of Health Canada.

The PMRA had previously issued a temporary registration (Regulatory Note REG2002-04) for these products with the requirement that Kemira Agro Oy carry out additional studies. These studies have now been completed. This product was submitted to the PMRA under the User Requested Minor Use Registration (URMUR) program.

Microbial pest control agents are increasingly being investigated for use as alternatives to conventional pesticides because they are thought to pose a lower potential risk to human health and the environment, compared with conventional pesticides. Mycostop Biofungicide represents a reduced risk option to chemical fungicide management tools.

The PMRA has carried out an assessment of available information in accordance with Section 9 of the Pest Control Products (PCP) Regulations and has found it sufficient pursuant to Section 18(*b*), to allow a determination of the safety, merit and value of the technical active ingredient Mycostop Biofungicide Technical and the end-use product Mycostop Biofungicide. The Agency has concluded that the use of the microorganism, *Streptomyces griseoviridis* strain K61, in the technical active ingredient Mycostop Biofungicide Technical and the end-use product Mycostop Biofungicide in accordance with the label has merit and value consistent with Section 18(*c*) of the PCP Regulations and does not entail an unacceptable risk of harm pursuant to Section 18(*d*). Therefore, based on the considerations outlined above, the use of the microbial *Streptomyces griseoviridis* strain K61 and Mycostop Biofungicide for control of damping-off, root and stem rot, and wilt caused by *Fusarium* on greenhouse cucumbers, tomatoes, peppers and greenhouse ornamentals are proposed for full registration, pursuant to Section 13 of the PCP Regulations.

The PMRA will accept written comments on this proposal up to 45 days from the date of publication of this document to allow interested parties an opportunity to provide input into the proposed registration decision for these products.

Table of Contents

1.0 Product characterization and analysis 1
1.1 Physical/chemical properties of the end-use product Mycostop 1
1.2 Details of uses 1
1.3 Biological properties of *Streptomyces griseoviridis* 2

2.0 Methods of analysis 3
2.1 Analysis for the active ingredient/microbial pest control agent 3
2.2 Analysis for microbial contaminants 3
2.3 Analysis for other unintentional ingredients 3

3.0 Human health and safety testing 4
3.1 Summary of toxicity and pathogenicity studies with Mycostop 4
3.2 Exposure assessment 4
3.3 Food and feed residue studies 4
3.4 Overall human health summary 5

4.0 Environmental toxicology studies 6
4.1 Summary of toxicity and pathogenicity of Mycostop to non-target organisms .. 6
4.2 Ecological risk assessment 6
4.2.1 Birds 6
4.2.2 Wild mammals 6
4.2.3 Fish 7
4.2.4 Arthropods 7
4.2.5 Non-arthropod invertebrates 8
4.2.6 Microorganisms 8
4.2.7 Non-target plants 8

5.0 Value assessment 9
5.1 Efficacy data and information 9

6.0 Toxic substances management policy 11

7.0 Proposed regulatory decision 11

List of Abbreviations 13

Appendix I Summary of toxicity and pathogenicity studies with Mycostop 15

Appendix II Summary of toxicity and pathogenicity of Mycostop to non-target organisms . 17

1.0 Product characterization and analysis

1.1 Physical/chemical properties of the end-use product Mycostop

Property	Mycostop Biofungicide
Physical state at 25°C	Finely divided powder; solid at room temperature
Colour	Brown to tan; standard Munsell 2.5Y 9/2
Odour	Fishy, putrid, woody, yeasty, sewery
pH in distilled water	1% slurry = 5.63; 10% slurry = 5.17
Density	459.4 kg/m^3
Viscosity	Not applicable
Corrosion character	Not applicable
Suspendability	No evaluation performed
Moisture content	No evaluation performed
Storage stability	1 year at 8°C

The guarantee for Mycostop Biofungicide is described as 30% *Streptomyces griseoviridis* strain K61 by weight or minimum 10^8 colony forming units (CFU)/g. A replacement Statement of Product Specifications Form (SPSF), indicating the minimum and maximum guarantee, was completed for Mycostop Biofungicide. Acceptable storage stability data were submitted for 13 batches of Mycostop Biofungicide stored at 8°C. Mycostop Biofungicide retained its guarantee of a minimum of 1×10^8 CFU/g for up to one year.

1.2 Details of uses

Mycostop Biofungicide is a biological fungicide containing dried mycelium and spores of the active ingredient *Streptomyces griseoviridis* strain K61, which was isolated in Finland from *Sphagnum* peat moss. Mycostop is a wettable powder formulation that has a guarantee of 1×10^8 colony forming units (CFU) per gram of product and will be marketed in foil-lined packets. The active ingredient, strain K61, has not been genetically modified or engineered through recombinant nucleic procedures.

Mycostop was first registered in Finland in 1990 and has since been registered in Bulgaria, Chile, Denmark, Estonia, Guatemala, Hungary, Iceland, Latvia, Norway, Sweden, Switzerland, Italy, Lithuania, Spain and The Netherlands. Mycostop was first registered in the U.S. (United States of America) in 1993 and registration in Canada is being sought under the URMUR program for control of damping-off, root and stem rot

1.0 Product characterization and analysis

1.1 Physical/chemical properties of the end-use product Mycostop

Property	Mycostop Biofungicide
Physical state at 25°C	Finely divided powder; solid at room temperature
Colour	Brown to tan; standard Munsell 2.5Y 9/2
Odour	Fishy, putrid, woody, yeasty, sewery
pH in distilled water	1% slurry = 5.63; 10% slurry = 5.17
Density	459.4 kg/m^3
Viscosity	Not applicable
Corrosion character	Not applicable
Suspendability	No evaluation performed
Moisture content	No evaluation performed
Storage stability	1 year at 8°C

The guarantee for Mycostop Biofungicide is described as 30% *Streptomyces griseoviridis* strain K61 by weight or minimum 10^8 colony forming units (CFU)/g. A replacement Statement of Product Specifications Form (SPSF), indicating the minimum and maximum guarantee, was completed for Mycostop Biofungicide. Acceptable storage stability data were submitted for 13 batches of Mycostop Biofungicide stored at 8°C. Mycostop Biofungicide retained its guarantee of a minimum of 1×10^8 CFU/g for up to one year.

1.2 Details of uses

Mycostop Biofungicide is a biological fungicide containing dried mycelium and spores of the active ingredient *Streptomyces griseoviridis* strain K61, which was isolated in Finland from *Sphagnum* peat moss. Mycostop is a wettable powder formulation that has a guarantee of 1×10^8 colony forming units (CFU) per gram of product and will be marketed in foil-lined packets. The active ingredient, strain K61, has not been genetically modified or engineered through recombinant nucleic procedures.

Mycostop was first registered in Finland in 1990 and has since been registered in Bulgaria, Chile, Denmark, Estonia, Guatemala, Hungary, Iceland, Latvia, Norway, Sweden, Switzerland, Italy, Lithuania, Spain and The Netherlands. Mycostop was first registered in the U.S. (United States of America) in 1993 and registration in Canada is being sought under the URMUR program for control of damping-off, root and stem rot

and wilt caused by *Fusarium* in greenhouse ornamentals and herbs, and in greenhouse vegetables (cucumbers, tomatoes, and peppers).

The proposed use includes seed treatment of vegetables, ornamentals and herbs, and the treatment of growth medium of vegetables and ornamentals (cut flowers and potted plants), bulbs and corms. Mycostop is to be applied directly to the root zone of the plant either by spraying, soil drenching, drip irrigation, dip treatment or as a seed treatment at rates that are to vary according to the crop and (or) growth stage of the crop to be treated (e.g., 10–50 mg/plant, 2–10 mg/plant pot, 2–20 g/100 m^2, 0.01% suspension, 2–8 g/kg seed), but generally in the range of 1.1–1.9 kg product/hectare (ha). Treatments are to be repeated at intervals of three to six weeks depending on disease pressure and the growth substrate. The number of applications will depend on the length of the growing period and disease pressure.

1.3 Biological properties of *Streptomyces griseoviridis*

Streptomyces griseoviridis strain K61 is a naturally occurring soil bacterium belonging to the family Streptomycetacea in the order Actinomycetales. The streptomycetes are widely distributed in terrestrial and aquatic habitats. They occur in almost all soil types. The number of streptomycetes living in soil varies greatly, both absolutely and proportionately, depending on soil type, moisture level, aeration, pH, depth in soil, amount of organic matter, cultivation measure, plant stand and time of the year. Soil, fodder and composts appear to be the primary reservoirs for streptomycetes. Most are strict saprophytes, but some form parasitic associations with plants or animals. Streptomycetes are typical soil microorganisms — their population is higher near the root surface as compared to non-rhizosphere soil at lower depths. Surprisingly little is known about the role of streptomycetes in natural environments, although evidence of their occurrence and numbers in habitats is extensive. Of the actinomycetes isolated from various soil types, the Streptomyces dominate, and a significant proportion of these are able to secrete antibiotics, restricting growth of other microbes. No specific data/information was provided on the natural occurrence of strain K61 other than that *S. griseoviridis*, in general, is a soil bacterium that favours soils high in humus content but can also thrive in other media.

Streptomycetes are also widely distributed in aquatic habitats, but the possibility of their wash-in from surrounding terrestrial habitats must always be considered. The ecology of streptomycetes in aquatic environments has not been well studied, with most studies focussing only on determining the numbers of streptomycetes in aquatic habitats by applying procedures designed for the selection of strains from terrestrial sources. Streptomycete spores may be washed into freshwater and marine habitats, but there is little evidence of their growth in river, lake or marine sediments.

The mode of action of *S. griseoviridis* strain K61 is based on a combination of mechanisms including colonization of rhizosphere in advance of the pathogen; competition for living space and nutrients; production of antifungal metabolites; lysis of

the pathogen cell wall followed by hyperparasitism; and general growth stimulation of the plant.

Streptomyces griseoviridis strain K61 in Mycostop is a preventative, not a curative, biofungicide. If the first application is made early enough (e.g., immediately after transplanting) the streptomycetes colonize the rhizosphere in advance of the pathogens and, thus, effectively compete with them for living space and nutrients. Strain K61 produces small quantities of an antifungal polyene compound that has been classified as a heptaene. However, it is not known whether this compound is involved in the disease control in rhizosphere. The mode of action of heptaenes is known to be binding to sterols of the cell membranes, thus, influencing the ion permeability across the membrane. The extracellular enzymes produced by streptomycetes, such as chitinase, degrade cell walls of fungal pathogens completely or partially, and may finally result in hyperparasitism.

2.0 Methods of analysis

2.1 Analysis for the active ingredient/microbial pest control agent

Appropriate methodologies for detection, isolation and enumeration of the active ingredient, strain K61, were detailed by the applicant. The active ingredient is differentiated from other bacteria and species of *Streptomyces* using non-molecular based methodologies, as these have yet to be adequately developed for the streptomycetes. Instead, the strain is differentiated from other species based on its carbon substrate utilization patterns, pigment formation, colony morphology on standard growth media, morphology of spore chains and spore surface structure.

2.2 Analysis for microbial contaminants

No human or animal pathogens are likely to occur during the manufacture or formulation of Mycostop. The microbiological purity of each production batch is monitored during fermentation by culture on solid growth media and by microscopic analysis and gram-stain preparations. Fermentations are routinely checked by visual inspection to ensure no abnormalities appear in colour, odour and foaming. The spread plate tests on agar growth media to determine viability of the active ingredient in each batch of dry end-use product are also capable of detecting microbiological contaminants. Using standard microbiological methods and selective growth media, analysis data from five batches of Mycostop revealed no contamination by bacteria or fungi at detection limits of <10 CFUs/g of dried product.

2.3 Analysis for other unintentional ingredients

No known toxic metabolites or hazardous substances are present in the technical or end-use products. All the components in the fermentation medium and all the formulation ingredients used are of food grade quality. Impurities in raw materials of fermentation and formulation, therefore, can be considered insignificant. Purity of the unformulated

microbial pest control agent (MPCA) is ensured by rinsing the equipment with 70% ethanol before mixing the formulation ingredients with the MPCA.

Although no toxins were detected in the technical or end-use products containing *S. griseoviridis* strain K61, other species of *Streptomyces* have been shown to be pathogenic to humans. Results of an extensive literature search for the keywords *Streptomyces griseoviridis* and toxin were submitted. The literature search did not yield any reports of toxins being produced by *Streptomyces griseoviridis* strain K61.

3.0 Human health and safety testing

3.1 Summary of toxicity and pathogenicity studies with Mycostop

See Appendix I.

3.2 Exposure assessment

The product has been used in Finland and other countries for over 16 years with no reports of adverse effects in users and other workers who would come into contact with the product under normal operational conditions. Biological dust emitted during handling of the dry end-product, however, may cause hypersensitivity in certain individuals. Two reports of hypersensitivity in workers, possibly initiated from pulmonary exposure to biological dust of the product, have been reported. Recommended protective measures were not followed in either incident and the adverse reactions were short-lived. The wearing of appropriate safety equipment should lower this potential risk to handlers and users of the product.

The information submitted on lack of significant toxicity during the use and application of Mycostop indicate that the acute pulmonary toxicity observed in the rat has not translated into similar observed human toxicity, with the possible exception being the two incidents involving human pulmonary reaction to biological dust. These incidents and the observed pulmonary effects in the rat indicate that appropriate respiratory tract coverings are to be worn during times of potential exposure.

3.3 Food and feed residue studies

An exemption from the requirement of a residue limit under the *Food and Drugs Act* (FDA) and Regulations is proposed for the residues of *S. griseoviridis* strain K61 in or on all raw agricultural commodities when used as a biofungicide for the treatment of seeds and cuttings of greenhouse crops (cucumber, tomato, pepper) and ornamentals. Based on the low level of toxicity of this organism in the acute oral toxicity study and the lack of production of known mammalian toxins, an exemption from the establishment of a residue limit is warranted. *Streptomyces griseoviridis* is a naturally occurring soil microbe and does not colonize plant tissues above the soil. Furthermore, Mycostop is used for inoculating growing media and seeds and no edible portion of the crop is treated directly

with the product. Tests conducted on cucumber found no detectable residues of *S. griseoviridis* strain K61.

Although a heptaenic antibiotic resembling candicidin and amphotericin have been identified as antifungal exudates of *S. griseoviridis* strain K61, very low concentrations are found in the end product (0.005% weight per weight), and production of this compound in soil following the application of Mycostop is expected to remain at concentrations comparable to background levels naturally present in soil. The heptaenes are also degraded by both visible and UV light. Furthermore, because heptaenic antibiotics are known to be poorly absorbed in the gastrointestinal tract and do not pose a particular human health concern, the establishment of a residue limit under the FDA and Regulations is not warranted for these compounds. The absence of adverse effects in test animals receiving topical and oral applications of Mycostop further supports this conclusion.

3.4 Overall human health summary

The registration package submitted by Kemira Agro Oy in support of registering Mycostop Biofungicide, containing the bacterium *S. griseoviridis* strain K61 as the active ingredient, under the URMUR program was reviewed and determined to be acceptable, though product characterization deficiencies were identified. The information provided to address the characterization of the active ingredient as well as the manufacturing process and quality control adequately addressed the potential human health and safety concerns associated with *S. griseoviridis* strain K61 and bacterial/fungal contaminants introduced during production. The PMRA concurs with the submitted U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Data Evaluation Reports (DERs) that *S. griseoviridis* strain K61 was neither pathogenic nor infective to rats when orally dosed with 3.0×10^9 CFU per animal (rat). No signs of toxicity or disease were present and clearance through the caecum was established. In the acute dermal toxicity test, the test organism was not toxic to rabbits when a single 2 g/kg dose was administered dermally. Intratracheal instillation of the test organism showed toxicity in rats dosed at about 3.5×10^7 CFU per animal. The test organism caused death in 54% of treated male and 48% of treated female rats. The organism was not pathogenic or infective. The LD_{50} value for the organism following intraperitoneal injection was 1306 mg/kg and 870 mg/kg in male and female mice, respectively. Since all clinical signs were resolved by day 3 of the test, the test organism was not considered infective. Toxicity was possibly due to the excessive quantity of the test material and the large size of the organism. A mild conjunctival irritation was elicited in the rabbit eye following administration of the test organism. No infectivity was noted. An overall moderate skin sensitization reaction was noted in treated guinea pigs 24 and 48 hours after treatment. In a reverse gene mutation assay, *S. griseoviridis* strain K61 was not genotoxic and a literature search found no reports of other strains of this species producing genotoxins. Two reports of hypersensitivity, possibly initiated from exposure to the product, have been reported. Recommended protective measures were not followed. The product has been used in Finland and other countries for over 16 years with

no reports of adverse effects in users and other workers who would come into contact with the product under normal operational conditions.

An exemption from the requirement of a maximum residue limit (MRL) is proposed to be established for the residues of *S. griseoviridis* strain K61 in or on all raw agricultural commodities when used as a fungicide for the treatment of seeds, cuttings, transplants and plants of greenhouse food crops. Based upon the low level of toxicity of this organism in the Tier I mammalian toxicity/pathogenicity studies, an exemption from MRL requirements is warranted.

The formulants in Mycostop Biofungicide are of food grade quality and do not pose any toxicological concerns.

4.0 Environmental toxicology studies

4.1 Summary of toxicity and pathogenicity of Mycostop to non-target organisms

See Appendix II.

4.2 Ecological risk assessment

4.2.1 Birds

Oral toxicity and pathogenicity studies on the northern bobwhite quail and mallard duck revealed no treatment-related toxicity or pathogenicity at total dosage levels of 12 500 mg/kg bw (1.22×10^{10} CFU/kg) administered at doses of 2500 mg/kg body weight (bw) per day for five consecutive days. The acute oral LD_{50} was determined to be greater than 2500 mg/kg bw and was classified as being practically non-toxic in both avian species.

The results of these studies indicate that Mycostop is practically non-toxic to terrestrial and aquatic avian species. Because intended uses involve greenhouse applications only, the possibility of direct avian exposure to *S. griseoviridis* strain K61 is extremely low; therefore, no avian risk is expected from the proposed uses of this product.

4.2.2 Wild mammals

The data submitted in Part M4, *Human Health and Safety*, indicated that there is no significant toxicity to rodents from acute oral testing at the maximum hazard dose. In light of these results and the restriction to greenhouse use, risks to mammalian wildlife is expected to be minimal to non-existent.

4.2.3 Fish

In a 30-day static renewal toxicity and pathogenicity study on the rainbow trout, the LC_{50} was found to be greater than 12.4 mg/L (7.1×10^5 CFU/mL) and the NOEL was 8.7 mg/L (5.0×10^4 CFU/mL). There was no evidence of infectivity. The LC_{50} value indicates that Mycostop is classified as slightly toxic to the rainbow trout.

In Canada, it is difficult to predict how much aquatic habitat will be exposed to products that are applied in greenhouses. The term "greenhouse" is somewhat ambiguous and, thus, problematic. Greenhouse structures may be very well-contained glasshouses, spanning over several hectares or they may be open, "lathe" houses covering only small areas. In view of the wide range of potential exposures of the MPCA to surface water or groundwater runoff from greenhouses, especially following drip irrigation, and because populations of *S. griseoviridis* strain K61 may survive in aquatic systems, some aquatic non-target organisms are likely to be exposed. Exposures are likely to be less dramatic if intended uses of the MPCA are limited to contained soil, plants and seeds, and if runoff can be adequately contained. Larger commercial greenhouse operations are also likely to use automatic watering systems, trough irrigation, spaghetti tubes and drip irrigation, so that watering crops to runoff may not be a widespread occurrence. In situations where there is runoff, it is highly likely that the majority of the MPCA will eventually drain or percolate into soil beneath or around greenhouses. Also, because streptomycetes are largely confined to the rhizosphere, *S. griseoviridis* strain K61 is less likely to be found in lower soil depths where it might percolate to groundwater.

To mitigate the risk of Mycostop to non-target fish, label use directions should be limited to contained soil and plants, or to seed treatments, and an environmental hazards statement should be added to the label indicating the product is toxic to fish.

4.2.4 Arthropods

In a dietary toxicity and pathogenicity study on the honey bee, the LC_{50} was found to be greater than 2400 mg/L (2.4×10^6 CFU/mL), which indicates that Mycostop is practically non-toxic to the honey bee. Even though the study was only supplemental due to nonspecific mortality in the controls, the results are reliable enough to indicate a low probability of adverse effects. Testing the toxicity/pathogenicity of the MPCA to other beneficial arthropods (i.e., predators and parasites) was not included in the submission.

Because intended uses involve directed applications as a soil drench, in drip irrigation systems, or as a seed treatment in greenhouse environments, the possibility of exposing the applied MPCA to a natural arthropod population is extremely low. Although it is difficult to characterize or assess the risks of *S. griseoviridis* strain K61 without additional toxicity/pathogenicity data, it appears unlikely that there would be irreversible adverse effects to beneficial arthropod releases resulting from unintended exposures, based upon the limited information regarding the ecology of streptomycetes in the soil environment.

In a static/renewal toxicity and pathogenicity study on the aquatic invertebrate *D. magna*, the EC_{50} was found to be 190 mg/L (1.9×10^5 CFU/mL), which indicates that Mycostop is practically non-toxic to aquatic invertebrate species. Any aquatic exposures resulting from greenhouse runoff are not likely to present a risk to aquatic invertebrate species.

4.2.5 Non-arthropod invertebrates

In a 14-day toxicity study on the earthworm, there were no treatment-related mortalities or other adverse effects. The NOEC was found to be greater than 1000 mg/kg of soil, the highest concentration tested. A critical review of the study was not conducted because it was not triggered under the current registration requirements for microbial pest control products. Considering that the intended uses of the product involve directed applications in greenhouses, coupled with the fact that species of *Streptomyces* comprise a significant proportion of the native microbial population in soils, the risks to non-arthropod invertebrate species is likely to be low to nonexistent. This conclusion is supported further if the results of the toxicity study are accepted as an indication of the toxicity of *S. griseoviridis* strain K61 to the earthworm. For example, the expected environmental concentration (EEC) in soil following direct application at the highest proposed label rate of 20 g/100 m^2, assuming a soil depth of 15 cm and density of 1.5 g/cm^3, would be 0.89 mg/kg. This EEC in soil is over three orders of magnitude lower than the NOEC value for the earthworm indicating that Mycostop would present a very low risk to terrestrial non-arthropod invertebrates should runoff from greenhouses occur.

4.2.6 Microorganisms

A waiver for microorganism testing was submitted based on the rationale that *S. griseoviridis* strain K61 is a naturally occurring soil microbe that lives in balance with other soil microorganisms; no adverse effects have been observed on non-target microorganisms exposed to this MPCA during the use and in field tests; and in the rhizosphere the MPCA has been shown to be fungistatic or suppressive against a limited number of plant pathogenic fungi. Data on the compatibility of Mycostop with two other biofungicide products were also submitted.

The submitted rationale is sufficient to waive non-target soil microorganism testing for the intended greenhouse uses of *S. griseoviridis* strain K61, though the MPCA is expected to produce adverse effects on other beneficial soil microorganisms, particularly fungi. Because the product is intended for greenhouse uses, the potential for significant off-target exposure to terrestrial environments is relatively low and there are unlikely to be irreversible effects on beneficial soil microorganisms resulting from unexpected exposures.

4.2.7 Non-target plants

No testing was conducted on non-target terrestrial or aquatic plant species. Waivers from plant testing were based on the rationale that *S. griseoviridis* strain K61 is a naturally

occurring soil microorganism and that no adverse effects have been observed in plants exposed to this organism during field trials in the U.S. and Finland. Of over 150 plants assessed for phytotoxicity after treatment with Mycostop, the only adverse effect was a slight reduction in germination in selected varieties of sweet corn, the ornamental *Centaurea cineraria* (Dusty Miller) and cantaloupe when the product was applied as a seed treatment alone or as a seed treatment followed by a drench or soil spray. Given the lack of toxicity/pathogenicity of Mycostop to a wide variety of plant types and the low potential for seeds of non-target plants to be exposed as a result of greenhouse applications, additional testing is considered unnecessary to conclude that Mycostop presents a low risk to non-target plants.

5.0 Value assessment

5.1 Efficacy data and information

Mycostop Biofungicide is a dry inoculant containing 1×10^8 CFU per g of *S. griseoviridis* strain K61, present as mycelium and spores. The product is applied as powder seed treatment, or is suspended in water for seedling spray, bulb dip, soil drip or drench treatment. It is intended for greenhouse use only.

Mycostop Biofungicide is proposed for control or suppression of soilborne diseases in greenhouse cucumber, tomato, pepper, and ornamentals. Label claims are:

- Has been shown to promote the growth and yield of plants even in healthy crops.
- For control of damping-off, root and stem rot and wilt caused by *Fusarium*.

Mycostop is applied dry as a seed treatment or suspended in water for soil spray, drench, drip irrigation or dip. Proposed use rates are:

- 5–50 mg product per plant in rockwool or pots
- 2–20 g product per 100 m^2 of growing medium in beds
- 0.01% suspension for dipping bulbs, corms or cuttings
- 2–8 g product per kg of seed

Soilborne pathogens are currently controlled by steaming (pasteurizing) growth mix, hot water treating of seed and greenhouse sanitation practices such as removing all plant debris, disinfecting equipment, adequate ventilation and drainage, and controlled light and humidity. There are several chemical products available for greenhouse soil treatments and some resistant/tolerant cultivars are available for *Fusarium* diseases. Limitations to the registered products include development of resistance, need for multiple applications in almost continuous production systems, and incompatibility with use of biological insect control.

In support of Mycostop, fourteen trials were submitted where *Fusarium* sp. was known to be present on greenhouse cucumber, pepper, tomato, carnation, cyclamen, primrose or

narcissus. Mycostop applied as a soil spray or drench at proposed rates (5–50 mg/plant; 100–200 mg/m^2 soil) was effective in reducing root rot, wilt, stunting, seedling death and *Fusarium* populations near roots. Yield was typically improved in treated plants (up to 132% of check). Seed treatment was also effective in improving emergence and yield. These effects were comparable to results obtained with chemical treatments. Rate and timing of applications was similar to that proposed, although a two-week interval was included in some trials.

Two methods of application were not accepted: bulb dip (narcissus) and cutting dip (carnation) with Mycostop solutions were not shown to be effective in reducing disease on their own and in some cases were noted as detrimental (see below).

In general, reduced emergence or other symptoms of phytotoxicity or pathogenicity were not observed in the efficacy trials with various crops. Treatment with Mycostop theoretically increases the population of this *Streptomyces* strain in soil by <0.1% and the applicant reported that this returns to base level after several months.

Some adverse response has been reported for specific situations. Dipping carnation cuttings in Mycostop suspensions of greater than 0.01% was noted as potentially phytotoxic, and reduced plant height, weight and flower yields were noted in trials where this method was used, even at 0.01%. The company has also indicated that reduced emergence is observed with dry product treatment rates of 5 g and 8 g/kg lettuce seed or with 8 g/kg gerbera or sweet pepper seed; however, data were not provided for these seed types. As a result, the above are not recommended for the label. It is not possible to test all ornamentals and, as a precaution, the grower should be directed to test the reaction of any new cultivars to Mycostop prior to using the product for commercial scale production.

Aside from cutting dips, yield effects of Mycostop were typically neutral or positive (e.g., 10–12% for seed treatment) even in the absence of known pathogens, and the claim for promotion of growth and yield of healthy plants is acceptable.

The claim of control of damping-off, root and stem rot and wilt caused by *Fusarium* is accepted for greenhouse cucumber, pepper, tomato and ornamentals at proposed rates. Cutting dip and bulb dip are not recommended. Seed treatment use is accepted with the exception of lettuce, gerbera and sweet pepper. The claim for promotion of growth and yield in healthy plants is accepted.

Mycostop is not expected to be prone to resistance, but has a role in reducing pathogen populations that might otherwise become resistant to chemical fungicides. It should not be tankmixed directly with fungicides but is believed to be compatible with products that would commonly be used in greenhouse production. The grower is referred to the manufacturer for a list of products tested for compatibility in lab conditions.

6.0 Toxic substances management policy

During the review of Mycostop Biofungicide, the federal Toxic Substances Management Policy[1] has been taken into account in that Regulatory Directive DIR99-03[2] has been followed. It has been determined that this product does not meet TSMP Track-1 criteria because the active ingredient is a biological organism and hence is not subject to the criteria used to define persistence, bioaccumulation and toxicity properties of chemical control products. Furthermore, the active ingredient (technical grade) does not contain any by-products or microcontaminants that meet the TSMP Track-1 criteria. Impurities of toxicological concern are not expected to be present in the raw materials nor are they expected to be generated in sufficient quantities during the manufacturing process to present a risk to human health and safety. Also, there are no formulants of toxicological concern present in the Mycostop Biofungicide end-use formulation.

7.0 Proposed regulatory decision

The PMRA has carried out an assessment of available information in accordance with Section 9 of the Pest Control Products (PCP) Regulations and has found it sufficient pursuant to Section 18(*b*), to allow a determination of the safety, merit, and value of the microbial *Streptomyces griseoviridis* strain K61 and Mycostop Biofungicide. The Agency has concluded that the use of the active microorganism, *Streptomyces griseoviridis* strain K61, in the technical grade active ingredient Mycostop Biofungicide Technical and the end-use product Mycostop Biofungicide in accordance with the label has merit and value consistent with Section 18(*c*) of the PCP Regulations and does not entail an unacceptable risk of harm pursuant to Section 18(*d*). Therefore, based on the considerations outlined above, the use of the microbial *Streptomyces griseoviridis* strain K61 and Mycostop Biofungicide for control of damping-off, root and stem rot, and wilt caused by *Fusarium* on greenhouse cucumbers, tomatoes, peppers and greenhouse ornamentals are proposed for full registration, under Section 13 of the PCP Regulations.

The PMRA will accept written comments on this proposal up to 45 days from the date of publication of this document to allow interested parties an opportunity to provide input into the proposed decision for full registration this product.

---

1 The federal Toxic Substances Management Policy is available through Environment Canada's Web Site at: http://www.ec.gc.ca/toxics

2 *The Pest Management Regulatory Agency's Strategy for Implementing the Toxic Substances Management Policy (TSMP)*, DIR99-03, is available through the Pest Management Information Services: Phone 1-800-267-6315 within Canada or 1-613-736-3799 outside Canada (long distance charges apply); Fax (613) 736-3798; E-mail pminfoserv@hc-sc.gc.ca or through our Web Site at http://www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla

List of Abbreviations

bw	body weight
CFU	colony forming units
EC_{50}	effective concentration 50%
EEC	expected environmental concentration
LC_{50}	lethal concentration 50%
LD_{50}	lethal dose 50%
LOEC	lowest observable effect concentration
LOEL	lowest observable effect level
MAS	maximum average score
NOAEL	no observed adverse effect level
NOEC	no observed effect concentration
NOEL	no observed effect level
PCP	Pest Control Products
SPSF	Statement of Product Specification Form
U.S.	United States of America
URMUR	User Requested Minor Use Registration

Appendix I Summary of toxicity and pathogenicity studies with Mycostop

Study	Species/strain and doses	LD_{50}, NOEL/NOAEL and LOEL*	Target organ/significant effects/ comments
Acute studies			
Oral	Rat, CD, 11/sex 3.0E+09 CFU/animal	LD_{50} > 3.0E+09 CFU/animal	Agent cleared from the gastrointestinal tract within three days of dosing and was not detected in the urine, blood or organs at any time. No mortalities and no clinical signs of toxicity or pathogenicity/infectivity. **NOT TOXIC OR PATHOGENIC**
Pulmonary	Rat, CD, 60/sex Males: 3.5E+07 CFU/animal Females: 3.02E+07 CFU/animal	$LD_{50} \leq$ 3.5E+07 CFU/animal (males) $LD_{50} \geq$ 3.02E+07 CFU/animal (females)	High mortality was observed in male (54%) and female (48%) rats treated with the live MPCA. Necropsy results revealed signs of lung irritation (red, inflated and autolysed tissue) in the pulmonary tract. Histopathological observations revealed further evidence of a severe pulmonary reaction to the MPCA. Early clearance from the lungs and lack of detection in the body fluids, organs and tissues of any test animal suggested MPCA was unlikely to be a pathogen. **TOXIC BUT NOT PATHOGENIC**
Injection	Intraperitoneal Injection Mouse, CD-1, 5/sex/group, 5000, 1000, 500 and 100 mg/kg bw (equal to 3.1–3.9E+06, 5.5–7.4E+06, 2.9–3.9E+06 and 5.8–7.7E+05 CFU/animal)	LD_{50} = 1306 mg/kg bw (males) LD_{50} = 870 mg/kg bw (females)	**5000 mg/kg bw:** 100% mortality in males and females. **1000 mg/kg bw:** 40% mortality in males. **500 mg/kg bw:** 40% mortality in females. Clinical observations consisted of rough hair coat, lethargy, hunched posture, closed eyes, laboured respiration, ocular discharge, subcutaneous lesions in males and females. All signs resolved by day 4; thus, MPCA was not considered infective. The large size of the MPCA and quantity of test material administered to the animals was a strong influence in the toxicity. **TOXIC BUT NOT PATHOGENIC**
Dermal toxicity and irritation	Rabbit, NZW, 5/sex, 2 g/kg bw (equal to 2.9E+09 CFU/kg bw)	LD_{50} > 2 g/kg bw	No mortalities, signs of systemic toxicity or dermal irritation. **NOT TOXIC OR IRRITATING**

Appendix I Summary of toxicity and pathogenicity studies with Mycostop

Study	Species/strain and doses	LD_{50}, NOEL/NOAEL and LOEL*	Target organ/significant effects/ comments
Acute studies			
Oral	Rat, CD, 11/sex 3.0E+09 CFU/animal	LD_{50} > 3.0E+09 CFU/animal	Agent cleared from the gastrointestinal tract within three days of dosing and was not detected in the urine, blood or organs at any time. No mortalities and no clinical signs of toxicity or pathogenicity/infectivity. **NOT TOXIC OR PATHOGENIC**
Pulmonary	Rat, CD, 60/sex Males: 3.5E+07 CFU/animal Females: 3.02E+07 CFU/animal	LD_{50} < 3.5E+07 CFU/animal (males) LD_{50} > 3.02E+07 CFU/animal (females)	High mortality was observed in male (54%) and female (48%) rats treated with the live MPCA. Necropsy results revealed signs of lung irritation (red, inflated and autolysed tissue) in the pulmonary tract. Histopathological observations revealed further evidence of a severe pulmonary reaction to the MPCA. Early clearance from the lungs and lack of detection in the body fluids, organs and tissues of any test animal suggested MPCA was unlikely to be a pathogen. **TOXIC BUT NOT PATHOGENIC**
Injection	Intraperitoneal Injection Mouse, CD-1, 5/sex/group, 5000, 1000, 500 and 100 mg/kg bw (equal to 3.1–3.9E+06, 5.5–7.4E+06, 2.9–3.9E+06 and 5.8–7.7E+05 CFU/animal)	LD_{50} = 1306 mg/kg bw (males) LD_{50} = 870 mg/kg bw (females)	**5000 mg/kg bw:** 100% mortality in males and females. **1000 mg/kg bw:** 40% mortality in males. **500 mg/kg bw:** 40% mortality in females. Clinical observations consisted of rough hair coat, lethargy, hunched posture, closed eyes, laboured respiration, ocular discharge, subcutaneous lesions in males and females. All signs resolved by day 4; thus, MPCA was not considered infective. The large size of the MPCA and quantity of test material administered to the animals was a strong influence in the toxicity. **TOXIC BUT NOT PATHOGENIC**
Dermal toxicity and irritation	Rabbit, NZW, 5/sex, 2 g/kg bw (equal to 2.9E+09 CFU/kg bw)	LD_{50} > 2 g/kg bw	No mortalities, signs of systemic toxicity or dermal irritation. **NOT TOXIC OR IRRITATING**

Study	Species/strain and doses	LD_{50}, NOEL/NOAEL and LOEL*	Target organ/significant effects/ comments
Eye irritation	Rabbit, NZW, 6 males, 100 mg dose (equal to 1.46E+08 CFU)	Maximum average score (MAS) = 6/110 (after one hour) MAS = 4/110 (at day 1)	**MILDLY IRRITATING**
Skin sensitization (Magnusson-Kligman Maximization Test)	Guinea pig, Dunkin-Hartley, 20 females, test material 5% intradermal injection (induction) followed by a topical application of 50% (challenge). No positive control tested.	After 48 hours, 55% of the test animals showed positive skin reactions with four having slight, but confluent or moderately patchy redness and seven having moderate redness.	**MODERATE SENSITIZER**
Mutagenicity			
Salmonellal Ames test	*S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	5, 15, 50, 150 and 500 μg/plate, ±S9	Negative

* LD_{50}: Lethal Dose 50%
NOEL: No observed effect level
NOAEL: No observed adverse effect level
LOEL: Lowest observable effect level

Appendix II Summary of toxicity and pathogenicity of Mycostop to non-target organisms

Study	Species/strain and doses	LD_{50}, NOEL/NOAEL and LOEL	Target organ/significant effects/ comments
Tier I studies			
30-day avian oral	Bobwhite Quail (*Colinus virginianus*), 30 birds, 2500 mg/kg bw (equal to 2.45E+09 CFU/kg bw) per day for five consecutive days	LD_{50} > 2500 mg/kg bw	No treatment-related mortalities, clinical signs of toxicity or pathogenicity/infectivity. **NOT TOXIC OR PATHOGENIC**
30-day avian oral	Mallard Duck (*Anus platyrhynchos*), 30 birds, 2500 mg/kg bw (equal to 2.45E+09 CFU/kg bw) per day for five consecutive days	LD_{50} > 2500 mg/kg bw	No treatment-related mortalities, clinical signs of toxicity or pathogenicity/infectivity. **NOT TOXIC OR PATHOGENIC**
30-day freshwater fish (static renewal)	Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), 10/group, 5 concentrations (2.5E+04 to 4.0E+05 CFU/mL)	LC_{50}* > 7.1E+04 CFU/mL (equal to 12.4 mg/L) NOEC = 5.0E+04 (equal to 8.7 mg/L)	Signs of toxicity included quiescence, surfacing, laboured respiration, discolouration, equilibrium loss. No signs of infectivity. **SLIGHTLY TOXIC**
5-day terrestrial arthropod (dietary)	Honey Bee (*Apis millifera*), 2 groups, 25/group, 240, 760 and 2400 mg/L (equal to 2.4E+05, 7.5E+05 and 2.4E+06 CFU/mL)	LC_{50} > 2400 mg/L NOEC** = 2400 mg/L	Mortalities observed in all dose groups and untreated controls. Mortality not dose responsive or treatment related. **PRACTICALLY NON-TOXIC**
21-day aquatic arthropod (static renewal)	Freshwater Daphnid (*Daphnia magna*), 4 groups, 5/group, 10, 100 and 1000 mg/L (equal to 1.0E+04, 1.0E+05 and 1.0E+06 CFU/mL)	EC_{50}*** = 190 mg/L (1.9E+05 CFU/mL) LOEC**** = 100 mg/L (1.0E+05 CFU/mL) NOEC = 10 mg/L (1.0E+04 CFU/mL)	No treatment-related effects for reproduction and time to first brood. 100%, 25% and 0% mortality at 1000, 100 and 10 mg/L, respectively. 100% mortality in heat-inactivated control. **PRACTICALLY NON-TOXIC**

* LC_{50}: Lethal Concentration 50%
** NOEC: No observed effect concentration
*** EC_{50}: Effect Concentration 50%
**** LOEC: Lowest observable effect concentration

Study	Species/strain and doses	LD_{50}, NOEL/NOAEL and LOEL*	Target organ/significant effects/ comments
Eye irritation	Rabbit, NZW, 6 males, 100 mg dose (equal to 1.46E+08 CFU)	Maximum average score (MAS) = 6/110 (after one hour) MAS = 4/110 (at day 1)	**MILDLY IRRITATING**
Skin sensitization (Magnusson Kligman Maximization Test)	Guinea pig, Dunkin-Hartley, 20 females, test material 5% intradermal injection (induction) followed by a topical application of 50% (challenge). No positive control tested.	After 48 hours, 55% of the test animals showed positive skin reactions with four having slight, but confluent or moderately patchy redness and seven having moderate redness.	**MODERATE SENSITIZER**
Mutagenicity			
Salmonella Ames test	*S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	5, 15, 50, 150 and 500 μg/plate, ±S9	Negative

* LD_{50}: Lethal Dose 50%
NOEL: No observed effect level
NOAEL: No observed adverse effect level
LOEL: Lowest observable effect level

Appendix II Summary of toxicity and pathogenicity of Mycostop to non-target organisms

Study	Species/strain and doses	LD_{50}, NOEL/NOAEL and LOEL	Target organ/significant effects/ comments
Tier I studies			
30-day avian oral	Bobwhite Quail (*Colinus virginianus*), 30 birds, 2500 mg/kg bw (equal to 2.45E+09 CFU/kg bw) per day for five consecutive days	LD_{50} > 2500 mg/kg bw	No treatment-related mortalities, clinical signs of toxicity or pathogenicity/infectivity. **NOT TOXIC OR PATHOGENIC**
30-day avian oral	Mallard Duck (*Anus platyrhynchos*), 30 birds, 2500 mg/kg bw (equal to 2.45E+09 CFU/kg bw) per day for five consecutive days	LD_{50} > 2500 mg/kg bw	No treatment-related mortalities, clinical signs of toxicity or pathogenicity/infectivity. **NOT TOXIC OR PATHOGENIC**
30-day freshwater fish (static renewal)	Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), 10/group, 5 concentrations (2.5E+04 to 4.0E+05 CFU/mL)	LC_{50}* > 7.1E+04 CFU/mL (equal to 12.4 mg/L) NOEC = 5.0E+04 (equal to 8.7 mg/L)	Signs of toxicity included quiescence, surfacing, laboured respiration, discolouration, equilibrium loss. No signs of infectivity. **SLIGHTLY TOXIC**
5-day terrestrial arthropod (dietary)	Honey Bee (*Apis millifera*), 2 groups, 25/group, 240, 760 and 2400 mg/L (equal to 2.4E+05, 7.5E+05 and 2.4E+06 CFU/mL)	LC_{50} > 2400 mg/L NOEC** = 2400 mg/L	Mortalities observed in all dose groups and untreated controls. Mortality not dose responsive or treatment related. **PRACTICALLY NON-TOXIC**
21-day aquatic arthropod (static renewal)	Freshwater Daphnid (*Daphnia magna*), 4 groups, 5/group, 10, 100 and 1000 mg/L (equal to 1.0E+04, 1.0E+05 and 1.0E+06 CFU/mL)	EC_{50}*** = 190 mg/L (1.9E+05 CFU/mL) LOEC**** = 100 mg/L (1.0E+05 CFU/mL) NOEC = 10 mg/L (1.0E+04 CFU/mL)	No treatment-related effects for reproduction and time to first brood. 100%, 25% and 0% mortality at 1000, 100 and 10 mg/L, respectively. 100% mortality in heat-inactivated control. **PRACTICALLY NON-TOXIC**

* LC_{50}: Lethal Concentration 50%
** NOEC: No observed effect concentration
*** EC_{50}: Effect Concentration 50%
**** LOEC: Lowest observable effect concentration

Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
Pest Management Regulatory Agency

Projet de décision réglementaire PRDD2003-07

Biofongicide Mycostop
Streptomyces griseoviridis souche K61

On propose l'homologation de la souche K61 du micro-organisme *Streptomyces griseoviridis* et sa préparation commerciale, le biofongicide Mycostop, en vertu de l'article 13 du *Règlement sur les produits antiparasitaires* (RPA). Ce produit a été mis au point pour combattre les maladies du concombre, de la tomate, du poivron et des plantes ornementales cultivées en serre. Il a été soumis à l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA), Santé Canada, dans le cadre du Programme d'homologation des usages limités à la demande des utilisateurs (PHULDU).

Ce projet de décision réglementaire présente un sommaire des données recueillies et la justification de la proposition d'homologation complète de ces produits. L'ARLA prendra connaissance des commentaires écrits, relatifs à cette proposition, jusque 45 jours après la date de publication du présent document. Prière de transmettre vos commentaires au coordonnateur des publications à l'adresse suivante.

(also available in English)

Le 10 avril 2003

Ce document est publié par la Division des nouvelles stratégies et des affaires réglementaires, Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec la :

Coordonnatrice des publications
Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
Santé Canada
I.A. 6605C
2720, promenade Riverside
Ottawa (Ontario)
K1A 0K9

Internet : pmra_publications@hc-sc.gc.ca
www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/
Service de renseignements :
1-800-267-6315 ou (613) 736-3799
Télécopieur : (613) 736-3798

ISBN: 0-662-88820-0
Numéro de catalogue : H113-9/2003-7F

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada 2003

Tous droits réservés. Il est interdit de reproduire ou de transmettre l'information (ou le contenu de la publication ou produit), sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit, enregistrement sur support magnétique, reproduction électronique, mécanique, ou par photocopie, ou autre, ou de l'emmagasiner dans un système de recouvrement, sans l'autorisation écrite préalable du Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, Ottawa, Ontario K1A 0S5.

Avant-propos

L'ARLA de Santé Canada, a évalué la demande d'homologation complète de la souche microbienne K61, *Streptomyces griseoviridis* et sa préparation commerciale, le biofongicide Mycostop, un biopesticide microbien fabriqué par la société Kemira Agro Oy, pour lutter contre la fonte des semis, la pourriture des racines et des tiges, et la flétrissure causée par le *Fusarium* sur le concombre, la tomate, le poivron et les plantes ornementales cultivé en serre.

L'ARLA a déjà accordé une homologation temporaire (note réglementaire REG2002-04) pour ces produits sous réserve que la société Kemira Agro Oy procède à des études supplémentaires. Ces études ont été complétées. Le produit a été soumis à l'ARLA dans le cadre du Programme d'homologation des usages limités à la demande des utilisateurs (PHULDU).

On envisage de plus en plus l'utilisation d'agents de lutte antiparasitaire microbiens comme solution de rechange aux pesticides conventionnels parce qu'ils semblent poser un risque moins élevé pour la santé humaine et l'environnement, par comparaison aux pesticides classiques. Le biofongicide Mycrostop constitue une solution à risque réduit en comparaison aux fongicides chimiques utilisés comme outil de contrôle.

L'ARLA a procédé à l'examen des données disponibles conformément à l'article 9 du RPA et il a été déterminé que les données se trouvaient en quantité suffisante, au sens de l'alinéa 18*b*), pour déterminer l'innocuité, les avantages et la valeur de la matière active de qualité technique du biofongicide Mycostop. L'Agence a conclu que l'utilisation du micro-organisme *Streptomyces griseoviridis* (souche K61) dans la matière active de qualité technique du produit technique Mycostop et sa préparation commerciale le biofongicide Mycostop, selon le mode d'emploi de l'étiquette, présente des avantages et une valeur conforme à l'alinéa 18*c*) du RPA et ne constitue pas un risque inacceptable au sens de l'alinéa 18*d*). Par conséquent, à la lumière des considérations mentionnées ci-dessus, il est proposé d'accorder une homologation complète pour l'utilisation de la souche microbienne K61 de l'organisme *Streptomyces griseoviridis,* et du biofongicide Mycostop, pour la lutte contre la fonte des semis, la pourriture des racines et de la tige et le flétrissement causé par le *Fusarium* sur le concombre, la tomate, le poivron et les plantes ornementales cultivées en serre, conformément à l'article 13 du RPA.

L'Agence prendra connaissance des commentaires écrits, relatifs à cette proposition, jusqu'à 45 jours après la date de publication de ce document afin de permettre aux parties intéressées de faire connaître leur avis quant à la proposition d'homologation de ces produits.

Table des matières

1.0 Caractérisation et analyse du produit 1
1.1 Propriétés physico-chimiques de la préparation commerciale Mycostop 1
1.2 Utilisation 1
1.3 Propriétés biologiques de *Streptomyces griseoviridis* 2

2.0 Méthodes d'analyse 3
2.1 Analyse de la matière active ou de l'agent microbien antiparasitaire 3
2.2 Détection de contaminants microbiens 3
2.3 Détection d'autres ingrédients non voulus 4

3.0 Essais relatifs à la santé humaine et à l'innocuité du produit 4
3.1 Sommaire des études sur la toxicité et la pathogénicité du Mycostop 4
3.2 Évaluation de l'exposition 4
3.3 Études sur les résidus dans les aliments destinés à la consommation humaine ou animale 5
3.4 Sommaire général des effets sur la santé humaine 6

4.0 Études sur l'écotoxicité 7
4.1 Sommaire de la toxicité et de la pathogénicité du Mycostop pour les organismes non visés 7
4.2 Évaluation du risque écologique 7
4.2.1 Avifaune 7
4.2.2 Mammifères sauvages 7
4.2.3 Poissons 7
4.2.4 Arthropodes 8
4.2.5 Invertébrés autres que des arthropodes 9
4.2.6 Micro-organismes 9
4.2.7 Végétaux non visés 10

5.0 Estimation de la valeur du produit 10
5.1 Données et renseignements sur l'efficacité du produit 10

6.0 Politique de gestion des substances toxiques 12

7.0 Décision réglementaire proposée 13

Liste des abréviations 15

Annexe I Sommaire des études sur la toxicité et la pathogénicité du Mycostop 17

Annexe II Sommaire de la toxicité et de la pathogénicité du Mycostop pour des organismes non visés 19

1.0 Caractérisation et analyse du produit

1.1 Propriétés physico-chimiques de la préparation commerciale Mycostop

Propriété	Biofongicide Mycostop
État physique à 25 °C	Poudre fine; solide à la température ambiante
Couleur	Brun à ocre; étalon Munsell 2.5Y 9/2
Odeur	De poisson, putride, de bois, de levure, d'égout
pH dans l'eau distillée	Boue liquide 1 % : 5,63; Boue liquide 10 % : 5,17
Densité	459,4 kg/m^3
Viscosité	Sans objet
Corrosivité	Sans objet
Suspensibilité	Aucune évaluation réalisée
Teneur en humidité	Aucune évaluation réalisée
Stabilité à l'entreposage	1 an à 8 °C

La garantie du biofongicide Mycostop indique une quantité de 30 % de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* par poids ou un minimum de 10^8 cellules souches unipotentes (CSU)/g. Un formulaire de déclaration des spécifications du produit (FDSP) de remplacement, indiquant les garanties minimales et maximales, a été remplie dans le cas du biofongicide Mycostop. Des données relatives à l'entreposage acceptables ont été fournies pour 13 lots de biofongicide Mycostop entreposés à 8 °C. Le biofongicide Mycostop conserve sa garantie d'un minimum de 1×10^8 CFU/g pendant un an.

1.2 Utilisation

Le biofongicide Mycostop est un fongicide biologique contenant des spores et des mycéliums déshydratés de la matière active, la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*. Cette souche a été isolée en Finlande dans la tourbe de sphaigne. Le Mycostop est une formulation en poudre mouillable offrant une garantie de 1×10^8 de cellules souches unipotentes (CFU) par gramme de produit. Il sera commercialisé en sachets métallisés. La matière active, la souche K61, n'a pas été mise au point par génie génétique ni modifiée par des méthodes de recombinaison nucléique.

Le Mycostop a été homologué pour la première fois en 1990 en Finlande. Ensuite, il l'a été en Bulgarie, au Chili, au Danemark, en Estonie, au Guatemala, en Hongrie, en Islande, en Lettonie, en Norvège, en Suède, en Suisse, en Italie, en Lituanie, en Espagne et aux Pays-Bas. Il a été homologué aux États-Unis (É.-U.) pour la première fois en 1993.

1.0 Caractérisation et analyse du produit

1.1 Propriétés physico-chimiques de la préparation commerciale Mycostop

Propriété	Biofongicide Mycostop
État physique à 25 °C	Poudre fine; solide à la température ambiante
Couleur	Brun à ocre; étalon Munsell 2.5Y 9/2
Odeur	De poisson, putride, de bois, de levure, d'égout
pH dans l'eau distillée	Boue liquide 1 % : 5,63; Boue liquide 10 % : 5,17
Densité	459,4 kg/m^3
Viscosité	Sans objet
Corrosivité	Sans objet
Suspensibilité	Aucune évaluation réalisée
Teneur en humidité	Aucune évaluation réalisée
Stabilité à l'entreposage	1 an à 8 °C

La garantie du biofongicide Mycostop indique une quantité de 30 % de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* par poids ou un minimum de 10^8 cellules souches unipotentes (CSU)/g. Un formulaire de déclaration des spécifications du produit (FDSP) de remplacement, indiquant les garanties minimales et maximales, a été remplie dans le cas du biofongicide Mycostop. Des données relatives à l'entreposage acceptables ont été fournies pour 13 lots de biofongicide Mycostop entreposés à 8 °C. Le biofongicide Mycostop conserve sa garantie d'un minimum de 1×10^8 CFU/g pendant un an.

1.2 Utilisation

Le biofongicide Mycostop est un fongicide biologique contenant des spores et des mycéliums déshydratés de la matière active, la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*. Cette souche a été isolée en Finlande dans la tourbe de sphaigne. Le Mycostop est une formulation en poudre mouillable offrant une garantie de 1×10^8 de cellules souches unipotentes (CFU) par gramme de produit. Il sera commercialisé en sachets métallisés. La matière active, la souche K61, n'a pas été mise au point par génie génétique ni modifiée par des méthodes de recombinaison nucléique.

Le Mycostop a été homologué pour la première fois en 1990 en Finlande. Ensuite, il l'a été en Bulgarie, au Chili, au Danemark, en Estonie, au Guatemala, en Hongrie, en Islande, en Lettonie, en Norvège, en Suède, en Suisse, en Italie, en Lituanie, en Espagne et aux Pays-Bas. Il a été homologué aux États-Unis (É.-U.) pour la première fois en 1993.

Une demande a été présentée au Canada, dans le cadre du PHULDU, afin de faire homologuer le Mycostop pour la lutte contre la fonte des semis, le pourridié fusarien, la pourriture fusarienne et la flétrissure fusarienne, ainsi que pour supprimer la pourriture pythéenne, le pourridié phytophthorien et le rhizoctone chez les plantes ornementales et les fines herbes cultivées en serre, et chez les légumes cultivés en serre (concombres, tomates et poivrons).

Les utilisations proposées comprennent le traitement des semences de légumes, de plantes ornementales et de fines herbes, le traitement des milieux de culture de légumes et de plantes ornementales (fleurs coupées et en pot), et celui des bulbes et des cormus. Le Mycostop doit être appliqué directement au niveau des racines de la plante, que ce soit par aspersion, par bassinage, par irrigation au goutte-à-goutte, par trempage ou par traitement des semences à des doses variables selon la culture et (ou) le stade de croissance de la culture à traiter (p. ex., 10 – 50 mg/plante, 2 – 10 mg/pot, 2 – 20 g/100 m^2, suspension à 0,01 %, 2 – 8 g/kg semences). En général, la dose est comprise entre 1,1 et 1,9 kg de produit à l'hectare (ha). Les traitements doivent être répétés à intervalles de trois à six semaines selon la pression exercée par la maladie et selon le substrat de croissance. Le nombre d'applications dépend de la durée de la saison de croissance et de la pression exercée par la maladie.

1.3 Propriétés biologiques de *Streptomyces griseoviridis*

La souche K61de *Streptomyces griseoviridis* est une bactérie vivant à l'état naturel dans le sol qui appartient à la famille des Streptomycétacées, de l'ordre des Actinomycétales. Les streptomycètes sont largement répartis dans les habitats terrestres et aquatiques. On les trouve dans presque tous les types de sols. Le nombre de streptomycètes vivant dans le sol varie considérablement, tant en chiffres absolus qu'en proportion, selon le type de sol, le degré d'humidité, l'aération, le pH, la profondeur dans le sol, la teneur en matières organiques, les pratiques agricoles, le type de peuplement et la période de l'année. Le sol, le fourrage et les composts semblent constituer les réservoirs primaires de streptomycètes. La plupart sont des saprophytes stricts, mais certains forment des associations parasitiques avec des plantes ou des animaux. Les streptomycètes sont des micro-organismes typiques des sols - leur population est plus élevée à hauteur de la rhizosphère qu'à de plus grandes profondeurs. On connaît étonnamment peu de chose du rôle des streptomycètes dans les milieux naturels malgré l'abondance des signes de leur présence et de leur nombre dans différents habitats. Les streptomycètes dominent en nombre l'ensemble des actinomycètes isolés dans différents types de sols. Une partie importante de ces streptomycètes a la capacité de sécréter des antibiotiques restreignant la multiplication des autres micro-organismes. Aucune donnée ni aucun renseignement spécifiques n'ont été fournis sur la présence à l'état naturel de la souche K61 sinon qu'en général, *Streptomyces griseoviridis* est une bactérie du sol qui marque une préférence pour les sols élevés en humus, mais qui peut aussi proliférer dans d'autres milieux.

En outre, les streptomycètes sont largement distribués dans les milieux aquatiques, mais il ne faut jamais écarter la possibilité qu'ils y soient entraînés dans l'eau à partir d'habitats

terrestres. L'écologie des streptomycètes dans les milieux aquatiques n'est pas très bien connue, la majeure partie des études portant uniquement sur leur dénombrement par application de méthodes conçues pour la sélection de souches de sources terrestres. Des spores de streptomycètes peuvent être entraînées par l'eau jusque dans des habitats d'eau douce ou salée, mais il existe peu d'indications selon lesquelles ils se multiplient dans les sédiments des cours d'eau ou des lacs, ou encore dans les sédiments marins.

Le mode d'action de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* résulte d'une combinaison de mécanismes comprenant la colonisation de la rhizosphère avant l'arrivée du pathogène, la compétition pour occuper l'espace vital et pour les nutriments, la production de métabolites antifongiques, la lyse des parois cellulaires des pathogènes suivie de l'hyperparasitisme et la stimulation générale de la croissance végétale.

La souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* dans le Mycostop est un biofongicide à effet préventif, non pas curatif. Lorsque la première application se fait assez tôt (p. ex., immédiatement après la transplantation), les streptomycètes colonisent la rhizosphère avant que les pathogènes ne le fassent. Par le fait même, ils les concurrencent efficacement sur le plan de l'occupation de l'espace et de l'accaparement des nutriments. Cette souche produit un composé polyénique antifongique en petites quantités, dont il a été déterminé qu'il s'agit d'un heptène. Par contre, il est impossible de savoir si ce composé touche le contrôle de la maladie dans la rhizosphère. On sait que les heptènes se fixent aux stérols de la membrane cellulaire dont ils modifient la perméabilité aux ions. Les enzymes extracellulaires produites par les streptomycètes, comme la chitinase, décomposent complètement ou partiellement les parois cellulaires des pathogènes fongiques et peuvent donner lieu à l'hyperparasitisme.

2.0 Méthodes d'analyse

2.1 Analyse de la matière active ou de l'agent microbien antiparasitaire

Le demandeur d'homologation a expliqué en détail les méthodes appropriées de détection, d'isolement et de dénombrement des organismes constituant la matière active, soit la souche K61. Celle-ci est différenciée des autres bactéries et espèces de *Streptomyces* au moyen de méthodes d'analyse non moléculaires puisque les méthodes d'analyse moléculaires ne sont pas encore au point dans le cas des streptomycètes. Pour distinguer cette souche de différentes espèces, on emploie plutôt des critères comme le profil d'utilisation des substrats carbonés, la formation de pigments, la morphologie des colonies sur des milieux de culture standard, la morphologie des chaînes de spores et la structure superficielle des spores.

2.2 Détection de contaminants microbiens

Il est peu probable qu'il se produise une contamination par des organismes pathogènes chez l'humain et chez les animaux au cours de la préparation ou de la formulation du Mycostop. Chaque lot de production fait l'objet d'un contrôle au cours de la fermentation,

par culture sur géloses, au moyen d'analyses au microscope et par des colorations Gram. Les cuves de fermentation sont régulièrement vérifiées par inspection visuelle pour s'assurer qu'il n'apparaît pas d'anomalies sur le plan de la couleur, de l'odeur et du moussage. Les essais par étalement sur géloses pour déterminer la viabilité de la matière active dans chaque lot de préparation commerciale déshydratée permettent également de détecter des contaminants microbiologiques. L'analyse du Mycostop, au moyen de méthodes microbiologiques normalisées et de milieux de croissance sélectifs, n'a révélé aucune contamination bactérienne ou fongique à des limites de détection < 10 CFU/g de produit déshydraté.

2.3 Détection d'autres ingrédients non voulus

Aucun métabolite toxique ni substance dangereuse connus sont présents dans la matière active de qualité technique ou dans la préparation commerciale. Tous les constituants du milieu de fermentation et tous les constituants de la formulation sont de qualité alimentaire. On peut donc considérer que les impuretés dans les matières brutes de fermentation et dans la formulation sont peu importantes. La pureté de l'agent microbien de lutte antiparasitaire (AMLA) non formulé est assurée par rinçage du matériel avec une solution d'éthanol à 70 % avant son mélange avec les constituants de la formulation.

Même si l'on a pas détecté de toxines dans les produits de qualité technique ou les préparations commerciales contenant la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*, d'autres espèces de *Streptomyces* se sont avérées pathogènes pour les humains. Les résultats d'une étude approfondie de la littérature pour les mots-clés *Streptomyces griseoviridis* et toxine ont été soumis. La recherche dans la littérature n'a permis d'identifier aucun rapport sur les toxines produites par la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*.

3.0 Essais relatifs à la santé humaine et à l'innocuité du produit

3.1 Sommaire des études sur la toxicité et la pathogénicité du Mycostop

Voir l'annexe I.

3.2 Évaluation de l'exposition

Ce produit est en usage depuis plus de 16 ans en Finlande et ailleurs sans qu'il y ait eu de rapports d'effets nocifs chez les utilisateurs et d'autres travailleurs qui seraient exposés au produit dans des conditions d'exploitation normales. Cependant, les poussières biologiques émises lors de la manutention de la préparation commerciale déshydratée peuvent être à l'origine d'hypersensibilité chez certaines personnes. Deux rapports d'hypersensibilité chez des travailleurs exposés par voie pulmonaire aux poussières biologiques ont été signalés. Les mesures de précaution recommandées n'avaient pas été appliquées et les réactions nocives ont été de courte durée. Le port d'un équipement de

protection adéquat devrait abaisser ce risque pour les personnes qui manutentionnent et qui utilisent ce produit.

Les renseignements communiqués sur l'absence de toxicité marquée pendant l'emploi et l'application du Mycostop chez le rat signifie qu'il n'existe pas chez l'humain de toxicité aiguë observée au niveau pulmonaire, à l'exception peut-être des deux accidents où l'on a observé des réactions pulmonaires aux poussières biologiques chez l'humain. Ces cas et les effets pulmonaires observés chez le rat montrent qu'il faut porter un dispositif approprié de protection des voies respiratoires au cours des périodes d'exposition potentielle.

3.3 Études sur les résidus dans les aliments destinés à la consommation humaine ou animale

Une exemption à l'exigence de fixer, en vertu de la *Loi sur les aliments et drogues* (LAD) et de son Règlement, une concentration limite pour les résidus sur et dans tous les produits agricoles bruts (PAB) est proposée dans le cas des résidus laissés par la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* lorsque ce produit est employé comme biofongicide pour le traitement des semences et des boutures de cultures en serre (concombre, tomate, poivron) et de plantes ornementales. Compte tenu de la faible toxicité de cet organisme observée dans l'étude sur la toxicité aiguë et de l'absence de production de toxines connues pour les mammifères, une exemption à l'établissement d'une limite de concentration pour les résidus est justifiée. *Streptomyces griseoviridis* est un micro-organisme naturel dans les sols et il ne colonise pas les parties aériennes des végétaux. De plus, le Mycostop est utilisé pour inoculer les milieux de croissance et les semences, et aucune partie comestible des plantes cultivées n'est traitée directement avec ce produit. Les essais effectués sur le concombre n'ont montré la présence d'aucun résidu en concentration détectable des micro-organismes de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*.

Même si un antibiotique hepténique s'apparentant à la candicidine et à l'amphotéricine a été identifié sous forme d'exsudat antifongique de la souche K61 de *S. griseoviridis*, de très faibles concentrations sont détectées dans la préparation commerciale (0,005 % p/p), et la production de ce composé dans le sol après l'application du Mycostop devrait rester à des concentrations comparables aux concentrations de fond dans les sols. D'ailleurs, les heptènes sont dégradés par la lumière visible et par le rayonnement UV. De plus, comme on sait que les antibiotiques du type heptènes sont peu absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal et qu'ils ne sont pas sources de préoccupations particulières sur le plan de la santé humaine, l'établissement d'une limite maximale de résidus en vertu de la LAD et de son règlement n'est pas justifiée dans le cas de ces produits. L'inexistence d'effets nocifs chez les sujets d'expérience traités par des applications topiques ou orales de Mycostop confirme cette conclusion.

3.4 Sommaire général des effets sur la santé humaine

Malgré des lacunes sur le plan de la caractérisation du produit, l'ARLA a examiné et jugé acceptable le dossier, présenté par Kemira Agro Oy dans le cadre du PHULDU, qui accompagnait la demande d'homologation du biofongicide Mycostop contenant la bactérie de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*. Les renseignements relatifs à la caractérisation de la matière active ainsi qu'au procédé de fabrication et au contrôle de qualité répondaient adéquatement aux préoccupations potentielles pour la santé et la sécurité des personnes en ce qui a trait à la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* et aux contaminants bactériens ou fongiques qui auraient pu être introduits à l'étape de la production. L'ARLA reconnaît la validité des rapports d'évaluation des données (Data Evaluation Reports ou DER) de l'Environmental Protection Agency (EPA) des É.-U., selon lesquels la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* n'a pas d'effet pathogène ou infectieux chez des rats à qui on a appliqué une dose quotidienne de $3,0 \times 10^9$ CFU par voie orale. Aucun signe de toxicité ou de maladie ne s'est manifesté et le dégagement au niveau du caecum a été démontré. Dans l'essai sur la toxicité aiguë par voie cutanée, l'organisme à l'essai n'était pas toxique pour des lapins à qui une dose unique de 2 g par kg était administrée. L'instillation intratrachéale de l'organisme à l'essai a conduit à des effets toxiques chez des rats à qui on avait administré une dose de $3,5 \times 10^7$ CFU par sujet. L'organisme à l'essai a causé la mort de 54 % des mâles et de 48 % des femelles traités. L'organisme n'était ni pathogène ni infectieux. La DL_{50} correspondant à l'injection intrapéritonéale de l'organisme à l'essai s'est chiffrée à 1306 mg/kg et à 870 mg/kg chez les mâles et chez les femelles de la souris, respectivement. Les signes cliniques s'étant tous résorbés au jour 3 de l'essai, on a considéré que cet organisme n'est pas infectieux. La toxicité était sans doute attribuable à la trop grande quantité de la substance à l'essai et à la forte taille de cet organisme. Les chercheurs ont observé une irritation bénigne de la conjonctive chez des lapins à qui ils ont administré l'organisme à l'essai par voie oculaire. Aucun signe d'infection n'a été observé. Au bilan, une sensibilisation cutanée modérée a été observée chez des cobayes au bout de 24 et de 48 h après leur traitement. Dans un essai de mutation inverse, la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* ne s'est pas révélée être génotoxique, et dans un dépouillement de la documentation scientifique, aucune étude n'a indiqué que d'autres souches produisaient des génotoxines. Deux articles sur l'hypersensibilité, peut-être attribuable à une exposition au produit, ont été signalés. Les mesures de précaution recommandées n'avaient pas été respectées. Ce produit est en usage en Finlande et dans d'autres pays depuis plus de 16 ans sans que des effets nocifs n'aient été signalés chez les utilisateurs et d'autres travailleurs qui auraient été en contact avec le produit dans des conditions normales d'exploitation.

On propose d'exempter la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* de l'exigence d'établir une limite maximale de résidus (LMR) dans ou sur tous les produits agricoles bruts lorsqu'elle est utilisée comme fongicide pour le traitement des semences, des boutures, des jeunes plants repiqués et des plantes alimentaires de culture obtenues en serre. Compte tenu de la faible toxicité dont a fait montre cet organisme dans les études

de premier niveau sur la pathogénicité et la toxicité pour les mammifères, l'exemption d'établir une LMR est justifiée.

Les constituants du biofongicide Mycostop sont de qualité alimentaire et ne sont à l'origine d'aucune préoccupation d'ordre toxicologique.

4.0 Études sur l'écotoxicité

4.1 Sommaire de la toxicité et de la pathogénicité du Mycostop pour les organismes non visés

Voir l'annexe II.

4.2 Évaluation du risque écologique

4.2.1 Avifaune

Les études de pathogénicité et de toxicité par voie orale chez le colin de Virginie et chez le colvert n'ont mis en lumière aucune toxicité ou pathogénicité attribuable au traitement à des doses totales atteignant 12 500 mg/kg m. c. ($1{,}22 \times 10^{10}$ CFU/kg) administrées à raison de 2500 mg/kg m. c. par jour pendant 5 jours consécutifs. Il a été déterminé que la DL_{50} aiguë administrée par voie orale est supérieure à 2500 mg/kg m. c. On juge que le produit est pratiquement non toxique pour ces deux espèces d'oiseaux.

Ces études indiquent que le Mycostop est pratiquement non toxique pour l'avifaune terrestre ou pour l'avifaune aquatique. Comme il est prévu que ce produit doit être appliqué uniquement en serre, la possibilité d'exposition directe de l'avifaune à la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* est extrêmement mince. Par conséquent, on prévoit que l'utilisation proposée de ce produit ne fera courir aucun risque à l'avifaune.

4.2.2 Mammifères sauvages

Les données présentées à la partie M4, *Human Health and Safety* (Essais relatifs à la santé humaine et à l'innocuité du produit), montrent qu'il n'existe pas de toxicité importante pour les rongeurs soumis à une exposition aiguë par voie orale à la dose maximale de danger. À la lumière de ces résultats, et compte tenu du fait que le produit est utilisé en serre uniquement, on estime que le risque pour les mammifères à l'état sauvage va de minime à inexistant.

4.2.3 Poissons

Dans le cadre d'une étude de 30 jours en milieu statique avec remplacement de l'eau relative à la pathogénicité et à la toxicité pour la truite arc-en-ciel, les chercheurs ont établi la CL_{50} à plus de 12,4 mg/L ($7{,}1 \times 10^5$ CFU/mL), et la concentration sans effet

observable (CSEO) à 8,7 mg/L ($5,0 \times 10^4$ CFU/mL). Il n'y avait aucun signe d'infection. La CL_{50} montre que le Mycostop est légèrement toxique pour la truite arc-en-ciel.

Au Canada, il est difficile de prévoir quelle partie de l'habitat aquatique serait exposée aux produits appliqués en serre. Ce terme de « serre » est un peu ambigu, ce qui est à l'origine de problèmes. Le terme « serre » peut tout autant s'appliquer à des serres proprement dites, en verre et très bien isolées du milieu, qui couvrent plusieurs acres, ou à des abris ouverts en lattis, couvrant de petites surfaces uniquement. Du fait de la grande variété de formes possibles d'exposition à l'AMLA dans l'eau de ruissellement ou dans l'eau d'écoulement provenant des serres, particulièrement suite à l'irrigation goutte-à-goutte, et parce que les populations de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* peuvent survivre dans les milieux aquatiques, certains organismes aquatiques non visés risquent d'y être exposés. Ces cas d'exposition seraient sûrement moins importants si les utilisations prévues de l'agent se cantonnaient à des sols, des plantes et des semences placés dans des espaces confinés, et si l'eau d'écoulement pouvait être contenue de façon adéquate. Les serriculteurs commerciaux les plus importants utilisent probablement des systèmes automatiques d'arrosage, que ce soit par irrigation, par des tubes en spaghetti ou par irrigation goutte-à-goutte, de telle sorte que l'arrosage des cultures au point de produire de l'écoulement n'est peut-être pas si fréquent. Et lorsqu'il s'en produit, il est fortement probable que la majeure partie de l'AMLA sera drainée ou va percoler dans le sol sous les serres ou à proximité. En outre, puisque les streptomycètes sont en grande partie confinés à la rhizosphère, il est moins probable que la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* puisse être trouvée à plus grande profondeur d'où elle pourrait percoler jusque dans l'eau souterraine.

De manière à atténuer le risque lié au Mycostop pour les poissons non visés, le profil d'emploi de ce produit figurant sur l'étiquette devrait préciser de l'exigence de se limiter aux sols et aux plantes placés dans des espaces confinés, ou au traitement des semences. Un énoncé sur le danger pour l'environnement devrait être ajouté sur l'étiquette, précisant que ce produit est toxique pour les poissons.

4.2.4 Arthropodes

Dans le cadre d'une étude sur la pathogénicité et sur la toxicité pour l'abeille domestique du produit administré dans le régime alimentaire, les chercheurs ont observé que la CL_{50} est supérieure à 2400 mg/L ($2,4 \times 10^6$ CFU/mL). Ce résultat montre que le Mycostop est pratiquement non toxique pour cette espèce. Même si cette étude avait uniquement valeur d'étude complémentaire à cause d'une mortalité non spécifique chez les témoins, il demeure que les résultats sont assez fiables pour indiquer une faible probabilité d'effets nocifs. L'essai de l'AMLA sur d'autres arthropodes utiles (prédateurs et parasites), pour déterminer sa pathogénicité et sa toxicité, ne figurait pas dans la demande.

La possibilité de l'exposition directe d'une population naturelle d'arthropodes à l'AMLA est extrêmement faible puisqu'on prévoit des utilisations telles que les applications dirigées par bassinage et par irrigation goutte-à-goutte ainsi que les traitements de

semences en serre. Bien qu'il soit difficile de caractériser ou d'évaluer les risques liés à la souche K61 de *S. griseoviridis* sans obtenir davantage de données sur sa pathogénicité et sa toxicité et s'il faut se fier aux renseignements limités que nous détenons sur l'écologie des streptomycètes dans les sols, il semble peu probable que l'exposition involontaire produise des effets nocifs irréversibles sur des arthropodes utiles lâchés dans le milieu.

Dans une étude sur la pathogénicité et la toxicité pour l'invertébré aquatique *D. magna*, en conditions statiques ou avec renouvellement de l'eau, les chercheurs ont constaté que la CE_{50} se chiffrait à 190 mg/L ($1,9 \times 10^5$ CFU/mL). Cela nous apprend que le Mycostop est pratiquement non toxique pour les invertébrés aquatiques. Toute exposition aquatique attribuable à des eaux d'écoulement provenant de serres ne fera probablement pas courir de risque aux invertébrés aquatiques.

4.2.5 Invertébrés autres que des arthropodes

Dans une étude de 14 jours sur la toxicité pour le lombric, les chercheurs n'ont observé aucune mortalité attribuable au traitement, ni aucun autre effet nocif. La CSEO est supérieure à 1000 mg/kg sol, soit la plus forte concentration testée. Il n'y a pas eu d'examen critique de l'étude parce qu'il n'a pas été déclenché en vertu des exigences en vigueur relatives à l'homologation de produits antiparasitaires microbiens. Compte tenu du fait que le mode d'emploi parle d'applications dirigées en serre, et compte tenu du fait que les espèces du groupe des *Streptomyces* comprennent une proportion importante des populations microbiennes indigènes des sols, on juge que le risque pour les invertébrés autres que les arthropodes va de faible à inexistant. Cette conclusion se trouve d'autant plus confirmée si on accepte que les résultats de l'étude sur la toxicité sont une indication de la toxicité de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* pour le lombric. Par exemple, la concentration prévue dans l'environnement (CPE), soit dans le sol, le cas échéant, s'élèverait à 0,89 mg/kgr après une application directe du produit à la plus forte concentration proposée sur l'étiquette (20 g/100 m^2) et en prenant pour hypothèse une profondeur de sol de 15 cm ainsi qu'une densité de 1,5 g/cm^3. Cette CPE dans le sol est inférieure par trois ordres de grandeur à la CSEO dans le cas du lombric. Cela signifie que le Mycostop présenterait un très faible risque pour les invertébrés terrestres autres que des arthropodes s'il se produisait un écoulement à partir des serres.

4.2.6 Micro-organismes

Une demande d'exemption des essais sur les micro-organismes a été présentée en faisant valoir que les micro-organismes de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* existent à l'état naturel dans le sol et qu'ils vivent en équilibre avec d'autres micro-organismes du sol. Aucun effet nocif n'a été observé sur les micro-organismes non visés qui ont été exposés à cet AMLA lors des essais au champ et lors de son utilisation. En outre, les chercheurs ont établi que dans la rhizosphère, l'AMLA est fongistatique ou réprime un nombre limité de champignons phytopathogènes. Enfin, des données sur la compatibilité du Mycostop avec deux autres biofongicides ont été présentées.

La justification présentée est assez solide pour que l'exemption soit accordée en ce qui a trait aux essais sur des micro-organismes du sol dans le cas des applications prévues en serre de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*, même s'il est prévu que l'AMLA exerce des effets nocifs sur d'autres micro-organismes utiles du sol, particulièrement les champignons. Puisque ce produit est destiné à être appliqué en serre, le risque d'exposition importante de l'environnement terrestre est relativement faible et il est peu probable que des effets nocifs irréversibles sur des micro-organismes utiles du sol apparaissent à la suite d'expositions imprévues.

4.2.7 Végétaux non visés

Aucun essai n'a été effectué sur des espèces végétales aquatiques ou terrestres non visées. Les exemptions concernant les essais sur les plantes se fondaient sur le raisonnement selon lequel la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* est une souche d'un micro-organisme trouvé à l'état naturel dans le sol et qu'aucun effet nocif n'a été observé chez les plantes exposées à cet organisme lors des essais au champ aux É.-U. et en Finlande. Sur plus de 150 végétaux sur lesquels la toxicité du Mycostop a été testée, le seul effet phytotoxique observé est une légère réduction de la germination chez des variétés choisies de maïs sucré, chez la plante ornementale *Centaurea cineraria* (Dusty Miller) et chez le melon brodé après une application du produit soit en seul traitement des semences ou soit en traitement des semences suivi d'un traitement par bassinage ou d'une aspersion au sol. Compte tenu de l'absence de toxicité et de pathogénicité du Mycostop pour une vaste gamme de types végétaux, ainsi que de la faible probabilité que les semences des végétaux non visés soient exposées au produit à la suite d'applications en serre, il a été jugé inutile de demander des essais additionnels afin de prouver que le Mycostop présente peu de risque pour les végétaux non visés.

5.0 Estimation de la valeur du produit

5.1 Données et renseignements sur l'efficacité du produit

Le biofongicide Mycostop est un inoculant anhydre contenant 1×10^8 CFU/g de la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis*, sous forme de spores et de mycéliums. Le produit est appliqué sous forme de poudre pour le traitement des semences ou en suspension dans l'eau pour l'aspersion des semis, pour le trempage des bulbes, pour l'irrigation goutte-à-goutte des sols ou pour le traitement par bassinage. Il doit uniquement être utilisé en serre.

Ce produit est proposé pour lutter ou supprimer des maladies transmises du sol au concombre, à la tomate, au poivron et aux plantes ornementales en serre. Les allégations des étiquettes disent que le produit :

- Favorise la croissance et le rendement des plantes, même dans les cultures en bon état.

- Permet de lutter contre la fonte des semis, le pourridié fusarien, la pourriture fusarienne et la flétrissure fusarienne.

Le Mycostop est appliqué à l'état déshydraté comme traitement des semences ou en suspension dans l'eau, sous forme d'une aspersion au sol, d'un traitement par bassinage, d'irrigation goutte-à-goutte ou par trempage. Les doses proposées sont les suivantes :

- 5 – 50 mg du produit par plante dans la laine minérale ou dans des pots
- 2 – 20 g du produit par 100 m^2 du milieu de croissance sur des lits
- 0,01 % en suspension pour le trempage des bulbes, des cormus ou des boutures
- 2 – 8 g du produit par kg de semences

Présentement, on combat les pathogènes transmis du sol par le traitement à la vapeur (pasteurisation) du mélange servant de milieu de croissance, par le traitement à l'eau chaude des semences ainsi que par des pratiques sanitaires en serre comme l'enlèvement de tous les débris végétaux, la désinfection du matériel, une ventilation et un drainage efficaces ainsi que des conditions d'éclairement et d'humidité ajustées. Il existe plusieurs produits chimiques pour le traitement des sols en serre et, en outre, il existe certains cultivars tolérants ou résistants aux maladies causées par *Fusarium*. L'acquisition de la résistance, le besoin de multiples applications dans les systèmes de production presque continue et l'incompatibilité avec l'emploi de la lutte biologique (insectes) sont des limites des produits homologués.

Pour étayer la demande d'homologation du Mycostop, 14 essais ont été soumis où la présence de *Fusarium* sp. était confirmée sur le concombre, le poivron, la tomate, l'oeillet, le cyclamen, la primevère ou le narcisse cultivés en serre. Le Mycostop, appliqué sous forme d'aspersion du sol ou par bassinage aux doses proposées (5 – 50 mg/plante, 100 – 200 mg/m^2 de sol), a permis de réduire efficacement le pourridié des racines, la flétrissure, le rabougrissement et la mort des plantules, ainsi que d'abaisser les populations de *Fusarium* à proximité des racines. Le rendement des plants traités était ordinairement amélioré (jusqu'à 132 % en comparaison des témoins). De plus, le traitement des semences a contribué efficacement à l'émergence et au rendement. Ces effets sont comparables aux résultats obtenus au moyen de traitements chimiques. La dose et la période de traitement retenues étaient semblables aux doses et périodes recommandées, quoiqu'un intervalle de deux semaines ait été appliqué dans certains essais.

Deux méthodes d'application ont été refusées : il n'a pas été établi que le trempage des bulbes (narcisse) et que celui des boutures (oeillet) dans des solutions de Mycostop constituaient un traitement efficace en soi pour réduire la maladie. En outre, on a observé que ces traitements étaient nuisibles dans certains cas (voir ci-après).

En général, les chercheurs n'ont pas observé de réduction de l'émergence ou d'autres symptômes de phytotoxicité ou de pathogénicité lors des essais sur l'efficacité du produit sur différentes cultures. En principe, le traitement au Mycostop hausse la population de

cette souche de *Streptomyces* dans le sol par moins de 0,1 %. Le demandeur signale que la concentration revient à sa normale au bout de plusieurs mois.

Des réactions nocives ont été signalées dans des cas précis. Ainsi, il est mentionné que de tremper des boutures d'oeillets dans des suspensions de Mycostop à une concentration supérieure à 0,01 % pourrait être phytotoxique, et que, dans des essais où il a été appliqué, ce traitement diminue la hauteur atteinte par les plantes, leur poids ainsi que leur production florale, même à une concentration de 0,01 %. L'entreprise a également indiqué qu'à des doses de 5 g et de 8 g/kg de semence de laitue ou de 8 g/kg de semence de gerbera ou de poivron doux, le traitement avec le produit déshydraté entraîne une baisse de l'émergence. Toutefois, elle n'a pas fourni de données sur ces types de semences. C'est pourquoi il n'est pas recommandé de faire figurer ces traitements sur l'étiquette. Devant l'impossibilité de tester toutes les plantes ornementales, et par précaution, on devrait recommander au producteur de tester la réaction au Mycostop de tout nouveau cultivar avant d'appliquer ce produit à l'échelle commerciale.

Mis à part le trempage des boutures, le Mycostop n'a pas d'effet ou a un effet bénéfique sur le rendement (p. ex., de 10 – 12 % dans le cas du traitement des semences), même en l'absence de pathogènes connus. L'allégation voulant que le produit favorise la croissance et le rendement des plantes en santé est acceptable.

L'allégation de lutte contre la fonte des semis, du pourridié fusarien, de la pourriture fusarienne et de la flétrissure fusarienne est acceptée pour le concombre, le poivron, la tomate et les plantes ornementales cultivés en serre aux doses proposées. Le trempage des boutures et celui des bulbes n'est pas recommandé. L'utilisation pour le traitement des semences est acceptée, à l'exception de la laitue, de gerbera et du poivron. L'allégation de la promotion de la croissance et du rendement chez les plantes en santé est acceptée.

On ne croit pas que le Mycostop puisse faire l'objet d'une résistance, mais il contribue à abaisser les populations de pathogènes qui, autrement, pourraient acquérir de la résistance aux fongicides chimiques. On devrait éviter de le mélanger en cuve directement avec des fongicides, mais il devrait être compatible avec les produits qui seraient d'usage courant en production serricole. Le producteur pourra se procurer auprès du fabricant une liste des produits dont la compatibilité avec le Mycostop a été mise à l'essai au laboratoire.

6.0 Politique de gestion des substances toxiques

Pendant l'examen du biofongicide Mycostop, la Politique de gestion des substances toxiques[1] du gouvernement fédéral a été prise en considération et la directive

---

[1] On peut accéder à la Politique de gestion des substances toxiques du gouvernement fédéral par l'entremise du site Internet d'Environnement Canada à l'adresse suivante : www.ec.gc.ca/toxics

réglementaire DIR99-03[2] a été suivie. Il a été déterminé que ce produit ne répond pas aux critères de la voie 1 de la PGST parce que son ingrédient actif est un organisme biologique; par conséquent il n'est pas assujetti aux critères utilisés pour définir la persistance, l'accumulation biologique, les propriété toxiques des produits antiparasitaires chimiques. En outre, la matière active (de qualité technique) ne contient aucun produit dérivé ni microcontaminant qui répond aux critères de la voie 1 de la PGST. Pendant le processus de fabrication, il est peu probable de détecter dans les matières brutes des impuretés toxiques en quantité suffisante pour présenter un risque pour la santé et la sécurité humaine. De plus, il n'y a aucun produit de formulation toxique dans la préparation commerciale du biofongicide Mycostop.

7.0 Décision réglementaire proposée

L'ARLA a procédé à l'examen des données disponibles conformément à l'article 9 du RPA et il a été déterminé que les données se trouvaient en quantité suffisante, au sens de l'alinéa 18*b*), pour déterminer l'innocuité, les avantages et la valeur de la matière active de qualité technique du biofongicide Mycostop. L'Agence a conclu que l'utilisation du micro-organisme *Streptomyces griseoviridis* (souche K61) dans la matière active de qualité technique du produit technique Mycostop et sa préparation commerciale le biofongicide Mycostop, selon le mode d'emploi de l'étiquette, présente des avantages et une valeur conforme à l'alinéa 18*c*) du RPA et ne constitue pas un risque inacceptable au sens de l'alinéa 18*d*). Par conséquent, à la lumière des considérations mentionnées ci-dessus, il est proposé d'accorder une homologation complète pour l'utilisation de la souche microbienne K61 de l'organisme *Streptomyces griseoviridis,* et du biofongicide Mycostop, pour la lutte contre la fonte des semis, la pourriture des racines et de la tige et le flétrissement causé par le *Fusarium* sur le concombre, la tomate, le poivron et les plantes ornementales cultivées en serre, conformément à l'article 13 du RPA.

L'Agence prendra connaissance des commentaires écrits, relatifs à cette proposition, jusqu'à 45 jours après la date de publication de ce document afin de permettre aux parties intéressées de faire connaître leur avis quant à la proposition d'homologation de ces produits.

---

[2] La stratégie de mise en oeuvre de la Politique de gestion des substances toxiques de l'ARLA, DIR99-03, est accessible du Service de renseignements de la lutte antiparasitaire : téléphone 1-800-267-6315 au Canada ou 1-613-736-3799 à l'extérieur du Canada (frais d'interurbain applicables); télécopieur (613) 736-3798; Courriel : pminfoserv@hc-sc.gc.ca ou par le biais de notre site Web : www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla

Liste des abréviations

AMLA	agent microbien de lutte antiparasitaire
ARLA	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
CE_{50}	concentration efficace à 50 %
CFU	cellules souches unipotentielles
CL_{50}	concentration létale à 50 %
CMM	cote moyenne maximale
CPE	concentration prévue dans l'environnement
CSEO	concentration sans effet observable
DL_{50}	dose létale à 50 %
DSENO	dose sans effet nocif observable
DSEO	dose sans effet observable
É.-U.	États-Unis
FDSP	Formulaire de déclaration des spécifications du produit
g	gramme
L	litre
LAD	Loi sur les aliments et drogues
m. c.	masse corporelle
mL	millilitre
p	poids
PFEOC	plus faible effet observable de concentration
PHULDU	Programme d'homologation des usages limités à la demande des utilisateurs
RPA	Règlement sur les produits antiparasitaires
SEO	seuil d'effets observables

Annexe I Sommaire des études sur la toxicité et la pathogénicité du Mycostop

Étude	Espèce/souche et doses	DL_{50}, DSEO/DSENO et SEO*	Organes cibles, effets significatifs, commentaires
Études sur la toxicité aiguë			
Oral	Rat, CD, 11/sexe 3,0E+09 CFU/animal	DL_{50} > 3,0E+09 CFU/animal	Agent éliminé du tractus gastrointestinal en moins de trois jours après l'administration de la dose. Jamais détecté dans l'urine, le sang ou les organes. Aucune mort, pas de signes cliniques de toxicité ou de pathogénicité ni d'infectivité. **NI TOXIQUE NI PATHOGÈNE**
Pulmonaire	Rat, CD, 60/sexe mâles : 3,5E+07 CFU/animal femelles : 3,02E+07 CFU/animal	$DL_{50} \leq$ 3,5E+07 CFU/animal (mâles) $DL_{50} \geq$ 3,02E+07 CFU/animal (femelles)	Mortalité élevée chez les mâles (54 %) et chez les femelles (48 %) traités avec l'AMLA vivant. L'autopsie a révélé des signes d'irritation des poumons (rougeur et inflammation tissulaires et autolyse) et dans les voies respiratoires. L'observation histopathologique a aussi révélé des signes d'une grave réaction pulmonaire à l'AMLA. L'élimination rapide dans les poumons et l'absence de l'AMLA dans les liquides organiques, les organes et les tissus de tous les sujets semblent indiquer que l'AMLA risque peu d'être un pathogène. **TOXIQUE, MAIS NON PATHOGÈNE**
Injection	Injection intraperitonéale souris, CD-1, 5/sexe/groupe, 5000, 1000, 500 et 100 mg/kg m. c. (équivalant à 3,1 – 3,9E+06, 5,5 – 7,4E+06, 2,9 – 3,9E+06 et 5,8 – 7,7E+05 CFU/animal)	DL_{50} = 1306 mg/kg m. c. (mâles) DL_{50} = 870 mg/kg m. c. (femelles)	**5000 mg/kg m. c. :** 100 % mortalité chez les mâles et chez les femelles. **1000 mg/kg m. c. :** 40 % mortalité chez les mâles. **500 mg/kg m. c. :** 40 % mortalité chez les femelles. Observations cliniques : fourrure mal lissée, léthargie, dos voûté, yeux fermés, respiration laborieuse, sécrétions oculaires, lésions sous-cutanées chez les mâles et les femelles. Tous les signes étaient disparus au jour 4; donc, l'AMLA n'a pas été jugé être infectieux. La grande taille de l'AMLA et la dose administrée aux sujets a fortement influé sur la toxicité. **TOXIQUE, MAIS NON PATHOGÈNE**

Annexe I Sommaire des études sur la toxicité et la pathogénicité du Mycostop

Étude	Espèce/souche et doses	DL_{50}, DSEO/DSENO et SEO*	Organes cibles, effets significatifs, commentaires
Études sur la toxicité aiguë			
Oral	Rat, CD, 11/sexe 3,0E+09 CFU/animal	DL_{50} > 3,0E+09 CFU/animal	Agent éliminé du tractus gastro-intestinal en moins de trois jours après l'administration de la dose. Jamais détecté dans l'urine, le sang ou les organes. Aucune mort, pas de signes cliniques de toxicité ou de pathogénicité ni d'infectivité. **NI TOXIQUE NI PATHOGÈNE**
Pulmonaire	Rat, CD, 60/sexe mâles : 3,5E+07 CFU/animal femelles : 3,0E+07 CFU/animal	DL_{50} : 3,5E+07 (CFU/animal (mâles) DL_{50} : 3,0E+07 CFU/animal (femelles)	Mortalité élevée chez les mâles (84 %) et chez les femelles (48 %) traités avec l'AMLA vivant. L'autopsie a révélé des signes d'irritation des poumons (rougeur et inflammation tissulaires et autolyse) et dans les voies respiratoires. L'observation histopathologique a aussi révélé des signes d'une grave réaction pulmonaire à l'AMLA. L'élimination rapide dans les poumons et l'absence de l'AMLA dans les liquides organiques, les organes et les tissus de tous les sujets semblent indiquer que l'AMLA risque peu d'être un pathogène. **TOXIQUE, MAIS NON PATHOGÈNE**
Injection	Injection intrapéritonéale souris, CD-1, 5/sexe/groupe, 5000, 1000, 500 et 100 mg/kg m. c. (équivalant à 3,1 – 3,9E+06, 5,5 – 7,1E+06, 2,9 – 3,9E+06 et 5,8 – 7,7E+05 CFU/animal)	DL_{50} : 1906 mg/kg m. c. (mâles) DL_{50} : 870 mg/kg m. c. (femelles)	**5000 mg/kg m. c. :** 100 % mortalité chez les mâles et chez les femelles. **1000 mg/kg m. c. :** 40 % mortalité chez les mâles. **500 mg/kg m. c. :** 40 % mortalité chez les femelles. Observations cliniques : fourrure mal lissée, léthargie, dos voûté, yeux fermés, respiration laborieuse, sécrétions oculaires, lésions sous-cutanées chez les mâles et les femelles. Tous les signes étaient disparus au jour 4, donc, l'AMLA n'a pas été jugé être infectieux. La grande taille de l'AMLA et la dose administrée aux sujets a fortement influé sur la toxicité. **TOXIQUE, MAIS NON PATHOGÈNE**

Étude	Espèce/souche et doses	DL_{50}, DSEO/DSENO et SEO*	Organes cibles, effets significatifs, commentaires
Irritation et toxicité pour la peau	Lapin, NZB, 5/sexe, 2 g/kg m. c. (équivalant à 2,9E+09 CFU/kg m. c.)	DL_{50} > 2 g/kg m. c.	Pas de mortalité, de signe de toxicité systémique ou d'irritation cutanée. **NI TOXIQUE NI IRRITANT**
Irritation des yeux	Lapin, NZB, 6 mâles, dose 100 mg (équivalant à 1,46E+08 CFU)	Cote moyenne maximale (CMM) = 6/110 (après 1 h) CMM = 4/110 (au jour 1)	**LÉGÈREMENT IRRITANT**
Sensibilisation de la peau (essai de maximisation Magnusson-Kligman)	Cobaye, Dunkin-Hartley, 20 femelles, injection sous-cutanée substance à l'essai à 5 % (induction), suivie d'une application topique à 50 % (provocation). Pas de témoin positif.	Après 48 h, 55 % des sujets manifestaient des signes cutanés positifs, 4 d'entre eux portant de légères plaques de rougeur confluentes ou modérément irrégulières, 7 ayant des rougeurs modérées.	**MODÉRÉMENT SENSIBILISANT**
Mutagénicité			
Salmonella, essai d'Ames	*S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	5, 15, 50, 150 et 500 µg/plaque, ±S9	Négatif

* DL_{50} : dose létale à 50 %
DSEO : concentration sans effet observable
DSENO : concentration sans effet nocif observable
SEO : seuil d'effets observables

Annexe II Sommaire de la toxicité et de la pathogénicité du Mycostop pour des organismes non visés

Étude	Espèce/souche et doses	DL_{50}, DSEO/DSENO et SEO*	Organes cibles, effets significatifs, commentaires
Études de niveau I			
Oiseau, orale, 30 jours	Colin de Virginie (*Colinus virginianus*), 30 sujets, 2500 mg/kg m. c. (égal à 2,45E+09 CFU/kg m. c.) par jour pendant 5 jours consécutifs	DL_{50} > 2500 mg/kg m. c.	Aucune mort, aucun signe clinique de toxicité ou de pathogénicité ni d'infectivité attribuables au traitement. **NI TOXIQUE NI PATHOGÈNE**
Oiseau, orale, 30 jours	Canard colvert (*Anus platyrhynchos*), 30 sujets, 2500 mg/kg m. c. (égal à 2,45E+09 CFU/kg m. c.) par jour pendant 5 jours consécutifs	DL_{50} > 2500 mg/kg m. c.	Aucune mort, aucun signe clinique de toxicité ou de pathogénicité ni d'infectivité attribuables au traitement. **NI TOXIQUE NI PATHOGÈNE**
Poisson d'eau douce, 30 jours (statique, eau remplacée)	Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), 10/groupe, 5 concentrations (2,5E+04 à 4,0E+05 CFU/mL)	CL_{50}* > 7,1E+04 CFU/mL (égal à 12,4 mg/L) CSEO = 5,0E+04 (égal à 8,7 mg/L)	Les signes de toxicité comprennent notamment : quiescence, remontée à la surface, respiration laborieuse, décoloration, perte d'équilibre. Aucun signe d'infection. **LÉGÈREMENT TOXIQUE**
Arthropodes, 5 jours (régime alimentaire)	Abeille domestique (*Apis millifera*), 2 groupes, 25/groupe, 240, 760 et 2400 mg/L (égal à 2,4E+05, 7,5E+05 et 2,4E+06 CFU/mL)	CL_{50} > 2400 mg/L CSEO** = 2400 mg/L	Mortalité dans tous les groupes traités et de témoins, non en fonction de la dose et sans rapport avec le traitement. **PRATIQUEMENT NON TOXIQUE**
Arthropodes aquatiques, 21 jours (statique, eau remplacée)	Daphnie d'eau douce (*Daphnia magna*), 4 groupes, 5/groupe, 10, 100 et 1000 mg/L (égal à 1,0E+04, 1,0E+05 et 1,0E+06 CFU/mL)	CE_{50}*** = 190 mg/L (1,9E+05 CFU/mL) SEO**** = 100 mg/L (1,0E+05 CFU/mL) CSEO = 10 mg/L (1,0E+04 CFU/mL)	Aucun effet lié au traitement sur le plan de la reproduction ou sur la durée avant la première ponte. 100 %, 25 % et 0 % de mortalité à 1000, 100 et 10 mg/L, respectivement. 100 % de mortalité pour l'agent inactivé à la chaleur. **PRATIQUEMENT NON TOXIQUE**

* CL_{50} : concentration létale à 50 %
** CSEO : concentration sans effet observable
*** CE_{50} : concentration avec effet 50 %
**** SEO : seuil d'effets observables

Étude	Espèce/souche et doses	DL_{50}, DSEO/DSENO et SEO*	Organes cibles, effets significatifs, commentaires
Irritation et toxicité pour la peau	Lapin, N/B, 5/sexe, 2 g/kg m.c. (équivalant à 2,9E+09 CFU/kg m.c.)	DL_{50} > 2 g/kg m.c.	Pas de mortalité, de signe de toxicité systémique ou d'irritation cutanée. **NI TOXIQUE NI IRRITANT**
Irritation des yeux	Lapin, N/B, 6 mâles, dose 100 mg (équivalant à 1,46E+08 CFU)	Cote moyenne maximale (CMM) = 6/110 (après 1 h) CMM = 4/110 (au jour 1)	**LÉGÈREMENT IRRITANT**
Sensibilisation de la peau (essai de maximisation – Magnusson-Kligman)	Cobaye, Dunkin Hartley, 20 femelles, injection sous-cutanée substance à l'essai à 5 % (induction), suivie d'une application topique à 50 % (provocation). Pas de témoin positif.	Après 48 h, 55 % des sujets manifestaient des signes cutanés positifs, 4 d'entre eux portant de légères plaques de rougeur confluentes ou modérément irrégulières, 7 ayant des rougeurs modérées.	**MODÉREMENT SENSIBILISANT**
Mutagénicité			
Salmonella, essai d'Ames	*S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	5, 15, 50, 150 et 500 µg/plaque, ±S9	Négatif

* DL_{50} = dose létale à 50 %
DSEO = concentration sans effet observable
DSENO = concentration sans effet nocif observable
SEO = seuil d'effets observables

Annexe II Sommaire de la toxicité et de la pathogénicité du Mycostop pour des organismes non visés

Étude	Espèce/souche et doses	DL_{50}, DSEO/DSENO et SEO*	Organes cibles, effets significatifs, commentaires
Études de niveau I			
Oiseau, orale, 30 jours	Colin de Virginie (*Colinus virginianus*), 30 sujets, 2500 mg/kg m. c. (égal à 2,45E+09 CFU/kg m. c.) par jour pendant 5 jours consécutifs	DL_{50} > 2500 mg/kg m. c.	Aucune mort, aucun signe clinique de toxicité ou de pathogénicité ni d'infectivité attribuables au traitement. **NI TOXIQUE NI PATHOGÈNE**
Oiseau, orale, 30 jours	Canard colvert (*Anas platyrhynchos*), 30 sujets, 2500 mg/kg m. c. (égal à 2,45E+09 CFU/kg m. c.) par jour pendant 5 jours consécutifs	DL_{50} > 2500 mg/kg m. c.	Aucune mort, aucun signe clinique de toxicité ou de pathogénicité ni d'infectivité attribuables au traitement. **NI TOXIQUE NI PATHOGÈNE**
Poisson d'eau douce, 30 jours (statique, eau remplacée)	Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), 10/groupe, 5 concentrations (2,5E+04 à 4,0E+05 CFU/mL)	CL_{50}* > 7,1E+04 CFU/mL (égal à 12,4 mg/L) CSEO** = 5,0E+04 (égal à 8,7 mg/L)	Les signes de toxicité comprennent notamment : quiescence, remontée à la surface, respiration laborieuse, décoloration, perte d'équilibre. Aucun signe d'infection. **LÉGÈREMENT TOXIQUE**
Arthropodes, 5 jours (régime alimentaire)	Abeille domestique (*Apis mellifera*), 2 groupes, 25/groupe, 240, 760 et 2400 mg/L (égal à 2,4E+05, 7,5E+05 et 2,4E+06 CFU/mL)	CL_{50} > 2400 mg/L CSEO** = 2400 mg/L	Mortalité dans tous les groupes traités et de témoins, non en fonction de la dose et sans rapport avec le traitement. **PRATIQUEMENT NON TOXIQUE**
Arthropodes aquatiques, 21 jours (statique, eau remplacée)	Daphnie d'eau douce (*Daphnia magna*), 4 groupes, 5/groupe, 10, 100 et 1000 mg/L (égal à 1,0E+04, 1,0E+05 et 1,0E+06 CFU/mL)	CE_{50}*** = 190 mg/L (1,9E+05 CFU/mL) SEO**** = 100 mg/L (1,0E+05 CFU/mL) CSEO = 10 mg/L (1,0E+04 CFU/mL)	Aucun effet lié au traitement sur le plan de la reproduction ou sur la durée avant la première ponte. 100 %, 25 % et 0 % de mortalité à 1000, 100 et 10 mg/L, respectivement. 100 % de mortalité pour l'agent inactivé à la chaleur. **PRATIQUEMENT NON TOXIQUE**

* CL_{50} : concentration létale à 50 %
** CSEO : concentration sans effet observable
*** CE_{50} : concentration avec effet 50 %
**** SEO : seuil d'effets observables